Nachweis und Bestimmung von „Histobasen“ in tierischen und pflanzlichen Nahrungsstoffen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der philosophischen Doktorwürde
der
Hohen Philosophischen Fakultät
Sektion II
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt am 20. November 1938
von

Artur Eberlein
aus
Oberbronn i. Elsaß

Referenten:

Prof. Dr. B. Bleyer

Dr. ing. habil., Dr. phil. W. Diemair

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 12. 38.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie an der Universität München und im Institut für Nahrungsmittelchemie an der Universität Frankfurt a. M., unter der Leitung von Herrn Professor Dr. B. Bleyer und Herrn Dr. Ing. habil. Dr. phil. W. Diemair vom 1. Oktober 1936 bis zum 1. Oktober 1938 ausgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Professor Dr. B. Bleyer und Herrn Dozent Dr. Ing. habil. Dr. phil. W. Diemair, die mir bei deren Ausführung stets in liebenswürdiger Weise zur Seite standen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinen hochverehrten Herren Lehrern für das Wohlwollen und Interesse, das sie meinen Studien jederzeit entgegenbrachten, auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einführung 7

B. Eigene Versuche 14

I. Nachweis und Bestimmung der „Histobasen" auf chemischem Weg 14

1) Isolierung der „Histobasen" 14

2) Reinigung und Trennung der „Histobasen" . . 19

3) Verbesserung des kolorimetrischen Bestimmungsverfahrens 23

4) Nachweis und Bestimmung von „Histobasen", Histidin und Histamin 34

II. Nachweis und Bestimmung der „Histobasen auf biologischem Weg 43

C Zusammenfassung 47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548304_0105

A. Einführung

Die Erkenntnisse und Erfahrungen sind im Hinblick auf die chemische und physikalisch-chemische Deutung der bei der Zubereitung der Nahrung sich abspielenden Vorgänge noch ziemlich lückenhaft und bedürfen in vielen Punkten noch der Aufklärung. Dies gilt insbesondere für das Vorkommen, die Entstehung, Veränderung und Freilegung physiologisch wichtiger Stoffgruppen, denen bisher zu wenig Beachtung geschenkt wurde. Erst die Erforschung der tierischen und pflanzlichen Wirkstoffgruppen: Vitamine, Hormone und Fermente und ihrer Beziehung zum Stoffwechselgeschehen veranlaßte dazu, sich mit solchen Stoffen zu beschäftigen, die in den Nahrungsmitteln sich vorfinden und unter gewissen chemischen, kolloid-chemischen und physikalisch-chemischen Einflüssen bei der Zubereitung eine Veränderung erleiden. Derartige Verbindungen haben zum Teil eine ähnliche Aufgabe wie die eben erwähnten Wirkstoffe, nämlich die, regulierend auf die stetig im menschlichen Organismus ablaufenden Reaktionen einzuwirken. In den meisten Fällen bleibt hierbei das vegetative Nervensystem unbeteiligt. Ihre Wirkung erfolgt in Übereinstimmung zu den Vitaminen und Hormonen weitgehend auf humoralem Wege, d. h. über die Blut- und Lymphbahnen. Der regulierende Einfluß solcher Stoffe und Stoffgruppen ist nicht immer von vornherein gegeben, sondern kann erst unter bestimmten, noch nicht oder nur zum Teil durchsichtigen Bedingungen in Erscheinung treten. Eine Änderung des physikochemischen Zustandes der Gewebslösung, eine Sensibilisierung durch unspezifische Eiweißkörper oder auch das Freiwerden aus einer inaktiven Vorstufe durch chemische Reize können die Ursache dazu sein. Auch hier ist wieder die Ähnlichkeit mit den Wirkstoffen festzustellen. In diese Gruppe von Stoffen gehören Verbindungen wie Cholin, Acetylcholin, Carnosin, Carnitin, Histidin, Histamin und deren näheren Verwandte. Die Zubereitung der Nahrung, die den Zweck verfolgt, dem Organismus die Stoffe in einer leichter verwertbaren Form zuzuführen und gleichzeitig durch Zugabe von Geruch- und Geschmackstoffen eine günstige Beeinflussung der Verdauungstätigkeit hervorzurufen, begünstigt auch die Frei-

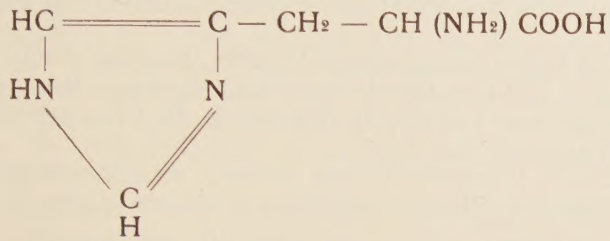
legung der oben beschriebenen Stoffgruppen. Während die seit urdenklichen Zeiten geübte Kochkunst diese Tatsache sicher schon rein erfahrungsgemäß benützt hat, war es der wissenschaftlichen Forschung bis heute nur in bescheidenem Maße gelungen, Einblick in die sich hier abspielenden, chemischen und biochemischen, physikalischen und kolloidchemischen Reaktionen zu gewinnen. Die chemische Aufklärung der Inhaltsbestandteile und ihre Veränderung machte erst Fortschritte mit dem Ausbau geeigneter chemischer und biologischer Nachweis- und Bestimmungsverfahren.

Aus den Arbeiten von A. Bickel[1]), I. Pawlow[2]), A. C. Ivy und A. I. Javois[3]) geht hervor, daß z. B. Fleischextrakte sowie Hydrolysate von Fleisch und Milch Stoffe enthalten, die eine starke Magensaftsekretion hervorrufen. Pawlow konnte dartun, daß für diese Wirkung nicht die Fleischextraktbestandteile Kreatin, Carnin, Sarkin, Xanthin und Leucin, sondern ein Gemisch aus Aminosäuren verantwortlich zu machen ist; zur gleichen Feststellung kamen auch andere Autoren. A. Korchow[4]) und A. Bickel[5]) konnten nun in Versuchen mit der Pawlow'schen Magenfistel Carnosin und Carnitin als Träger der „Sekretin"-Wirkung ermitteln. Bei der Untersuchung von Maggiwürze gelang die Freilegung einer Fraktion mit ähnlicher Wirkung, ohne daß aber eine der beschriebenen Substanzen identifiziert werden konnte. Auch auf die Steigerung der Magensaftsekretion durch Histamin macht A. Bickel aufmerksam, während C. v. Eweyk und M. Tennenbaum[6]) eine thermische Dekarboxylierung des Histidins durch kurzes Erhitzen auf 250 - 300° beobachten konnten. Eine eingehende Würdigung seiner physiologischen Wirksamkeit fand Histamin durch Dale[7]), Feldberg und Schilf[8]), Bickel[9]) und v. Noorden[10]). Mit der Frage der Entstehung und Freilegung von „Histobasen" durch den Röstvorgang beschäftigten sich in jüngster Zeit B. Bleyer, W. Diemair, F. Fischler und K. Täufel[11]), die den Nachweis führten, daß durch das Rösten eine Freilegung dieser Stoffgruppe erfolgt*). Die in chemischer Hinsicht als Substanzen mit Histidin- und Histamincharakter erkannten Verbindungen konnten auch auf Grund ihres biologischen Verhaltens als Histidinabkömmlinge identifiziert werden.

---

1) Internat. Beiträge z. Pathol. u. Therapie der Ernährungsstörung, **5**, H. I
2) aufgeführt in Korchow, Biochem. Z. **190**, 188 (1927)
3) The Amer. J. of Physiol. **73**, 3, 583-90, (1925)
4) Biochem. Ztschr., **190**, 188, (1927)
5) Biochem. Ztschr., **199**, 434, (1929)
6) Biochem. Ztschr., **125**, 238, (1921)
vergl. A. Bickel u. C. v. Eweyk, Sitz. Ber. d. Akad. d. Wiss. S. 328, (1921)
7) vergl. W. Feldberg u. E. Schilf, „Histamin", Verlag J. Springer, Berlin, (1930)
8) loc. cit.
9) Zeitschr. Volksernährg., **9**, 1, (1934)
10) Med. Klinik, **30**, 825 u. 858, (1934)
11) Biochem. Ztschr. **286**, 408, (1936); **289**, 27, (1936); **292**, 301, (1937)
*) Histidin und Histamin wurde in dieser Arbeit der Einfachheit halber unter dem Namen „Histobasen" zusammengefaßt.

Das von A. Kossel[1]) entdeckte Histidin ist nach den Untersuchungen von H. Pauly[2]), F. Knoop und A. Windaus[3]) eine Imidazol-α-Aminopropionsäure:



Die erste synthetische Darstellung gelang Fr. L. Pyman[4]). Mit den Aminosäuren Arginin und Lysin gehört es zu den von Kossel so benannten „Hexonbasen". Das weit verbreitete Vorkommen des Histidins in pflanzlichem und tierischem Eiweiß ist durch zahlreiche Schrifttumsangaben bestätigt. Aus den Arbeiten von M. T. Hanke[5]) geht hervor, daß Histidin mit der Nahrung dem tierischen Organismus zugeführt und zum Aufbau der Eiweißstoffe benötigt wird.

Die Untersuchungen von C. Hooper, F. S. Robscheit und G. Whipple[6]) weisen auf die Beteiligung bei der Bildung des roten Blutfarbstoffes hin. Eine gewiße Bestätigung findet diese Vorstellung in dem Vorkommen von Histidin im Ochsenblut, aus dem es auch dargestellt wird.

Nach jüngst veröffentlichten Arbeiten von R. Kuhn und F. Desnuelle[7]) ist es als Bestandteil der prosthetischen Gruppe des gelben Fermentes ermittelt worden.

Das Vorkommen des Histidins im pflanzlichen Organismus beweist R. Engeland[8]) durch eine Untersuchung des Harns von Pflanzenfressern. Die vor kurzem festgestellte vermehrte Histidinausscheidung im Harn gravider Frauen wurde zur Schwangerschaftsfrühdiagnose heranzuziehen versucht, versagte aber infolge der Unregelmäßigkeit seines Vorkommens und an dem Nachweis von Histidin auch im Harn nicht gravider Frauen. Die Bedeutung des Histidins in der Ernährung und im Stoffwechsel ist sichergestellt.

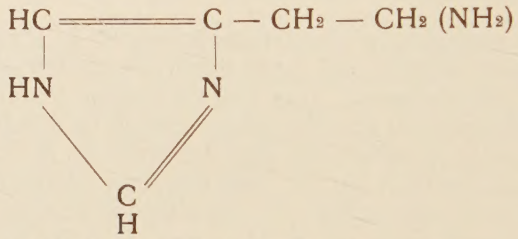
Die in den letzten Jahren übliche Anwendung des Histidins als Therapeutikum hat bedeutende Erfolge zu verzeichnen. So konnte es z. B. zur Behandlung von Anämien aller Art verwendet werden[9]);

1) Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chem. **22**, 177, (1896/97)
2) Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chem. **42**, 508, (1904)
3) Hofmeisters Beiträge, **7**, 144, (1905)
4) J. chem. Soc., London, **109**, 186, (1926)
5) J. biol. Chemistry, **66**, 489, (1925)
6) Amer. J. Physiol., 553, 263 (1920)
7) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 251, 19 (1938)
8) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **57**, 49 (1908)
9) Langeron L. M. Paget, T. Senellart Ann. Méd., **31**, 246, (1932)

G. Fontès und L. Thivolle[1]) weisen auch die Histidin-Wirkung in, bei Anämien angewandten Leberextrakten nach, die im Zusammenhang mit einer Tryptophanwirkung stehen soll. Von anderer Seite wird die Bedeutung des Histidins neben Cholin für die Hämatopoese betont.

Zur Verwendung gelangte Histidin, ferner in der Ulcustherapie bei Magen- und Darmgeschwüren mit teils gutem, teils wechselndem Erfolg. (R. Korbsch[2]), H. Winter[3]), D. Flechtenmacher[4]), K. Neidhardt[5])).

Durch Dekarboxylierung entsteht aus dem Histidin das in physiologischer Hinsicht ungleich wirksamere Histamin.



Es wurde von G. Barger, H. H. Dale[6]) und gleichzeitig von F. Kutscher[7]) im Mutterkorn entdeckt.

Histamin ist ein normaler Bestandteil fast sämtlicher Organe, außer der Nebenniere und der Hypophyse. Vor kurzem konnte es D. Ackermann[8]) aus lebendfrischer Leber kristallin gewinnen. Die synthetische Darstellung gelang A. Windaus und W. Vogt[9]) und später F. L. Pyman[10]). Die Gewinnung gelingt gut nach D. Ackermann[11]) auf bakteriellem Wege. Die Dekarboxylierung des Histidins kann auf chemisch-physikalischem, bakteriellem und fermentativem Wege erfolgen. Nach den Untersuchungen von A. J. Ewins und F. L. Pyman[12]) erhält man durch Erhitzen im Einschlußrohr nur sehr geringe Mengen Histamin. Eine Dekarboxylierung durch Ultraviolettbestrahlung gelang Fr. Ellinger[13]). Mit der bakteriellen Entstehung von Histamin beschäftigte sich eine ganze Reihe von Autoren. (D. Ackermann[14]), A. Berthelot und D. M.

1) C. R. Acad. Sci., **191**, 1395 (1930); C. R. Séances. Soc. Biol., **106**, 219 (1931)
2) Arch. Verdauungskrankh., **59**, 82 (1936)
3) Med. Klinik, **31**, 686 (1935); **31**, 1307 (1936)
4) Ztr. Chir., **16**, 922 (1937)
5) Therap. d. Gegenwart, **4**, 186 (1937)
6) J. Soc. Chem., London (II) **97**, 2592 (1910)
7) Zbl. Physiol., **24**, 885 (1910)
8) Hoppe-Seyler's Z. **255**, 75 (1938)
9) Ber. dtsch. chem. Ges., **40**, 3691 (1907)
10) J. chem. Soc. London, **99**, 668 (1911)
11) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **65**, 604 (1910)
12) J. chem. Soc. London, **99**, 339 (1911)
13) Arch. exper. Pathol., **136**, 129 (1929)
14) siehe 11

Bertrand[1]), E. Mellanby und F. H. Twort[2]), M. T. Hanke und K. K. Koessler[3])). Zu diesem Zwecke hat sich vor allem Bacterium coli geeignet gezeigt. In ganz ähnlicher Weise entstehen aus anderen Aminosäuren die entsprechenden Amine, so z. B. aus Ornithin das Putrescin, aus Lysin das Cadaverin und aus Tyrosin das Tyramin; letzteres hat ganz ähnliche Eigenschaften wie Histamin. Solche, oft toxisch wirkende Stoffe können leicht bei funktionellen Störungen des menschlichen Organismus entstehen, wie durch den Nachweis von Histamin im Darm z. B. bei Obstipation und bei Darmverschluß dargetan wird.

Von großem Interesse ist auch im Zusammenhang mit der vorliegenden Aufgabenstellung die fermentative Dekarboxylierung des Histidins, ein Vorgang, durch den scheinbar auch im tierischen Organismus die Entstehung des Histamins bedingt wird.

P. Holtz[4]) und Mitarbeiter (P. Holtz und G. Triem[5]) P. Holtz und R. Heise[6]) sowie S. Edlbacher und A. v Segesser[7]) machen auf die Beteiligung der Ascorbinsäure und der Sulfhydrylverbindung bei Gegenwart von Sauerstoff im Histidinabbau aufmerksam. Beim Schütteln von Kaninchen-Nierenschnitten in l-Histidinhaltiger Tyrodelösung konnten E. Werle[8]) und E. Werle und H. Hermann[9]) die Bildung von Histamin eindeutig nachweisen.

Abgesehen von der klinischen Verwendung als „Histaminprobe" zur Erzeugung einer erhöhten Magensaftsekretion wird Histamin therapeutisch bei den verschiedensten Krankheitssymptomen angewandt. Erwähnenswert ist dabei seine Wirkung bei Allergien aller Art, z. B. Migräne oder Bronchialasthma, die mit der Erweiterung der Blutgefäße des Hirns in Beziehung zu stehen scheinen[10]).

Die Ergebnisse der letzten Jahre in chemischer und physiologischer Beziehung bestätigen die Annahme, daß dem „Histobasekomplex" im Stoffwechselgeschehen des menschlichen Organismus eine besondere Aufgabe zufällt. Damit ist auch die Frage seines Vorkommens und seiner Bildung in den Nahrungsstoffen in den Mittelpuukt des Interesses gerückt und in diesem Zusammenhang auch die Aufgabe der mengenmäßigen Bestimmung.

Zum Nachweis und zur Bestimmung von „Histobasen" dienen chemische und biologische Verfahren. Zum chemischen Nachweis bedient man sich einerseits des Bromadditonsvermögens, anderer-

1) C. R. Acad. Sci. **154**, 1643 (1910)
2) J. Physiology, **45**, 53, (1912)
3) J. Physiology, **59**, 879 (1924)
4) Naturwiss. H. 36, 589 (1937)
5) Naturwiss. H. 16, 251 (1937)
6) Chemiker-Ztg. I, **2**, 3667 (1937)
7) Naturwiss. H. 34, 556 (1937)
8) Biochem. Z. **288**, 292 (1936)
9) Biochem. Z. **291**, 105 (1937)
10) H. Bruch, Klin. Wschr., Jahrg. 16, **7**, 236

seits des Kupplungsvermögens mit Diazoverbindungen. Mit dem von F. Knoop[1]) entdekten Bromadditionsvermögen beschäftigten sich in der Folgezeit verschiedene Forscher (J. Hunter[2]), H. Plimmer und M. Phillips[3])), Fr. Lieben und R. Müller[4])), feststellen konnten, daß zunächst 2 Atome Brom substituierend wirken, bei Bromüberschuß jedoch noch ein drittes Atom mit oxydiernder Wirkung gebunden wird. Das auf diesen Erfahrungen aufgebaute Bestimmungsverfahren von R. Kapeller-Adler[5]) beruht auf einer vorsichtigen Bromierung und Bildung eines Farbstoffes durch Zusatz eines Ammoniak-Ammonkarbonatgemisches. Die kolorimetrische Auswertung erfolgt im Stufenphotometer. Dieses Verfahren hat den Nachteil, der Unzulänglichkeit bei der Bromzugabe, da sich ein Brommangel ebenso wie ein Bromüberschuß in starken Streuungen der Farbwerte auswirkt. Nach Angaben von N. Louros und N. Meschkowa[6]) bewegt sich die untere Erfassungsgrenze um etwa 0,6 mg/ccm spricht also nur bei relativ großen Histidinmengen an.

Vorwiegend wird aber das Histidin mit Hilfe des von H. Pauly[7]) aufgefundenen Verfahrens der Kupplung mit Diazokörpern angewandt. Schon früher hatte Wallach und seine Schüler[8]) beobachten können, daß die Imidazolkörper zu kuppeln imstande sind.

Die Pauly'sche Diazoreaktion wird so durchgeführt, daß Histidin in sodaalkalischen Lösung mit Diazobenzolsulfonsäure gekuppelt wird, wobei eine dunkelkirschrote Färbung auftritt, die selbst beim Verdünnen mit der vielfachen Menge Wasser (zum Unterschied von Tyrosin) keine Veränderung nach Gelb erfährt.

Dies Verfahren wurde in der Folgezeit verschiedentlich verbessert und abgeändert, so vor allem von R. Inouye[9]), der durch Benzoylierung den störenden Einfluß des Tyrosins auszuschalten versuchte. Eine mengenmäßige Bestimmung mit Hilfe dieser Reaktion versuchten M. Weiß und N. Scobolew[10]). Störungen bei der kolorimetrischen Auswertung, die in der Reaktion selbst, sowie in der fehlenden Isolierung und Reinigung begründet lagen, ließen die Methode als unzureichend erscheinen. Bedeutend bessere Ergebnisse wurden jedoch mit dem Verfahren von M. T. Hanke und K. K. Koessler[11]) erhalten, die eine Isolierung und Reinigung der „Histobasen" vor der Bestimmung einschalten.

1) loc. cit.
2) Biochem. Z., **16**, 638 (1922)
3) Biochemical J., **18**, 312 (1924)
4) Biochem. Z., **197**, 127 (1928)
5) Biochem. Z., **264**, 131 (1933)
6) Klin. Wschr., **32**, 1165 (1934); Hoppe-Seyler's Z. physicol. Chem. **240**, 199 (1936)
7) Hoppe-Seyler's Z. physicol. Chem., **42**, 508 (1904)
8) Liebigs Ann. Chem., **271**, 28 (1892) (F. Rung und M. Behrend)
9) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **83**, 79 (1913)
10) Biochem. Z. **58**, 119 (1914)
11) J. biol. Chemistry, **39**, 497 (1919); **43**, 527 (1920

Auch die Titrationsmethoden von C. L. Lautenschläger[1]) gehen auf die Pauly'sche Reaktion zurück; einerseits beruhen sie auf der unmittelbaren Verwendung der Diazoniumlösung zur Titration, andererseits auf der Reduktion des gebildeten Azofarbstoffes mit Hilfe von Titantrichlorid und Rücktitration des Überschusses mit Eisenalaun.

Die geschilderten Verfahren eignen sich zwar gut zur Bestimmung von Histidin, wenn Lösungen ohne Eigenfarbe vorliegen versagen aber bei gefärbten Untersuchungslösungen. Die Verwendung von oberflächenaktiven Stoffen zur Entfärbung ist wegen des damit verbundenen unvermeidlichen Verlustes von Histobasen nicht möglich. Man verwendet daher anstelle der Sulfanilsäure als Kupplungspartner p-Nitranilin. Der große Vorzug liegt hierbei in der Ausschüttelbarkeit des gebildeten Farbstoffes mit einem Gemisch aus Butylalkohol-Pyridin (9:1). Ausserdem gelingt es aber, gegenüber der Pauly'schen Reaktion die Genauigkeit um das 50-fache zu verstärken (1:5000000). In gleicher Weise verwendet E. Gebauer-Fuclnegg[2]) bei seinen Untersuchungen nicht sulfonierte Basen p-Nitranilin und p-Toluidin, wobei er feststellt, daß sich der Histaminazofarbstoff mit roter, der Tyrosinazofarbstoff dagegen mit brauner bis braungrüner Farbe in Butylalkohol löst. Die Verwendungsfähigkeit von p-Aminobenzoesäureaethylester haben mit gutem Erfolg H. Luers und Mitarbeiter[3]) untersucht. Das Kupplungsprodukt — ein tiefroter Farbstoff — läßt sich gut mit einem Gemisch von Amylalkohol-Aether (1:3) ausschütteln. Gegenüber der Verwendung von p-Nitranilin besitzt jedoch dieses Verfahren keine Vorteile.

Für das chemische Nachweisverfahren bildet eine notwendige Ergänzung der biologische Test. Vor allem läßt sich Histamin, dessen starke Kontraktionswirkung auf die glatte Muskulatur seit langem bekannt ist, auf Grund der überaus großen Empfindlichkeit des überlebenden Meerschweinchen-Darmes noch in außerordentlich geringen Mengen nachweisen. Nach W. Feldberg und E. Schilf[4]) beträgt die Grenzkonzentration 1:750000000 - 1:1 Milliarde. Mit Hilfe eines Kymographions wird die Reizbarkeit der Darmstücke kurvenmäßig auf einer berußten Unterlage aufgezeichnet.

Diese Art des biologischen Nachweises wurde auch in der Gemeinschaftsarbeit von B. Bleyer, W. Diemair, F. Fischler und K. Täufel[5]) gewählt, wobei sie sich im Hinblick auf die geringen Histaminmengen als besonders wertvoll erwies.

---

1) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **102**, 226 (1918)
2) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chemie, **191**, 222 (1930)
3) F. Stricker Inaug. Dissertation, Techn. Hochschule München (1937)
4) loc. cit.
5) loc. cit.

Unter Zuhilfenahme der vorliegenden Schrifttumsangaben ergab sich als Aufgabe der vorliegendenden Arbeit, einen Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Histobasen in den verschiedensten Nahrungsstoffen zu liefern. Gleichzeitig sollte eine Verbesserung der Methode zur Isolierung und Reinigung sowie zur kolorimetrischen Bestimmung erfolgen.

B. Eigene Versuche

I. Nachweis und Bestimmung der „Histobasen" auf chemischem Weg.

1. Isolierung der „Histobasen".

Dem beschriebenen kolorimetrischen Nachweisverfahren für „Histobasen" haftet der Mangel an, daß es nicht spezifisch für Histamin oder Histidin ist. Dies geht nicht nur aus den eigenen Versuchen sondern auch aus den verschiedenen Literaturangaben hervor, die darauf hinweisen, daß eine ganze Anzahl organischer Verbindungen auf die Pauly'sche Reaktion ansprechen und somit das Ergebnis verfälschen. Zu diesen Stoffen gehören allgemein: Naphtole, Amine, Imidazol und seine Abkömmlinge wie Imidazolylpropionsäure, Imidazolylakrylsäure und Carnosin. Unter den Phenolen wirkt vor allem, wie ja schon bekannt, das Tyrosin störend, das vielfach gemeinsam mit Histidin und Histamin auftritt. Bemerkenswert ist auch, daß der Pyrrolkern (Pyrrol und Pyrrolin) unter Bildung eines kräftig rot- bis rotbraun gefärbten Farbstoffes reagiert, während dies bei Pyrrolidin und Prolin (Pyrrolidincarbonsäure) nicht der Fall ist. Auch die Purinkörper (die man sich durch Verschmelzung eines Pyrimidinringes mit einem Imidazolring entstanden denken kann) geben die Diazoreaktion; Ammoniak und Ammonsalze liefern ebenfalls rote Farbstoffe, wobei die Annahme einer intermediären Bildung aromatischer Aminoverbindungen berechtigt erscheint. Auf den störenden Einfluß der NH_2-Gruppe des Alaninwertes wurde in jüngst erschienenen Veröffentlichungen von H. Eagle u. P. Vickers[1]) u. W. Diemair und H. Fox[2]) hingewiesen. Eine Reihe von Stoffen, die in der Tabelle 1 übersichtlich zusammengefaßt sind, kuppeln mit p-Nitranilin unter Farbstoffbildung.

1) J. biol. Chemistry, **114**, 193-97 (1936)
2) Biochem. Z. **298**, B. 8 (1938)

Tabelle 1

Nr.	Verbindung	Diazoreaktion
1	Histidin	Positiv
2	Histamin	„
3	Tyrosin	„ (schwach)
4	Tryptophan	„ (NH_2-Gruppe)
5	Lysin	„ (NH_2-Gruppe)
6	Arginin	„ (NH_2-Gruppe)
7	d-Alanin	„ (NH_2-Gruppe)
8	d-l-Alanin	„ (NH_2-Gruppe)
9	Pyrrol	„
10	Pyrrolin	„
11	Pyridin	„
12	Guanin	„
13	Adenin	„ (schwach)
14	Theophyllin	„
15	Imidazol	„
16	Imidazolylpropionsäure	„
17	Imidazolylakrylsäure	„
18	Carnosin	„
19	Methylhistidin (Methyl am Alaninrest)	„
20	Xanthin	„
21	Hypoxanthin	„
22	Uracil	„
23	Thymin	„
24	Convicin	„
25	Vitamin B_1	„

Englische Forscher[1]) konnten den Nachweis erbringen, daß Kupplungsreaktionen reiner Histamin- oder Histidinlösungen ausbleiben bei gleichzeitiger Gegenwart von Proteinstoffen. Aus diesem Grunde muß vor dem Nachweis und der Bestimmung eine Freilegung und Reinigung der „Histobasen" erfolgen, die mit einer Entfernung der störenden Stoffe verbunden sein muß. Alle Enteiweisungsverfahren, die auf der Erzeugung voluminöser Niederschläge beruhen, sei es nun Tannin-Bleiacetat – oder Alkoholfällungen, kommen hierbei nicht in Betracht, da gleichzeitig auch ein Teil der „Histobasen" aus der Lösung mitgerissen wird, der beim Auswaschen des Niederschlages nicht mehr wiedergewonnen werden kann. Die Zerstörung

1) C. H. Best, H. M. Dale, H. W. Dudley und W. H. Thorpe, J. Physiol., **62**, 397 (1937).

der Proteinstoffe wurde daher mit konz. Salzsäure durchgeführt, und zwar mit der 3-fachen Menge konz. Salzsäure berechnet auf Trockensubstanz Die Hydrolyse wurde in einem Schliffkolben von etwa 250 ccm Inhalt am Rückflußkühler vorgenommen. Bei trockenen Substanzen wurde 2 Stunden auf dem Wasserbade und hierauf 6 Stunden auf dem Asbestdrahtnetz über freier Flamme erhitzt. Bei Flüssigkeiten erfolgte das Erhitzen sofort über freier Flamme, wobei zunächst vorsichtig angeheizt werden mußte, um ein zu starkes Schäumen zu vermeiden. Das durch Huminstoffe schwarz gefärbte Hydrolysat wurde nach dem Erkalten durch ein Glasfilter filtriert und der Rückstand gut nachwaschen. Das Filtrat wurde nun 3-mal im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt, wobei immer mit viel Wasser wieder aufgefüllt wurde. Die von dem größten Teil der Salzsäure befreite Lösung wurde hierauf in einem Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt.

Die Hydrolyse kann auch mit verdünnter Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure durchgeführt werden. Um jedoch die Aufarbeitung möglichst zu vereinfachen und um Verluste zu vermeiden, wie sie vor allem bei der Entfernung der Schwefelsäure als Bariumsulfat zu befürchten sind, wurde das beschriebene Arbeitsverfahren gewählt.

Für die Abtrennung der Hexonbasengruppe, zu der Histidin und Hisiamin gehören, sind verschiedene Methoden im Schrifttum beschrieben worden. Das älteste und grundlegende Verfahren stammt von A. Kossel und F. Kutscher[1]). Es beruht auf einer Fällung mit Silbernitrat. Hierbei fallen, je nachdem ob man in neutraler oder stark barythaltiger Lösung arbeitet, die Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion (Filtrat). Nach einer umständlichen weiteren Reinigung kann in den einzelnen Fraktionen der Stickstoff bestimmt werden. Eine Verbesserung dieses Verfahrens, bei dem sich vor allem die Herstellung der richtigen Acidität als schwierig erwies, beschrieben A. Kossel und A. I. Patten[2]).

An Stelle von Silbernitrat wird Quecksilbersulfat verwendet, das von F. G. Hopkins und S. W. Cole[3]) zur Ausfällung des Tryptophans emfohlen wurde. Quecksilbersulfat wird auch von R. Kapeller-Adler[4]) bei der quantitativen Bestimmung von Histidin in Eiweißhydrolysaten benutzt, wobei sich das Hopkin'sche Reagens als gutes Fällungsmittel erweist. In einer Arbeit von C. L. Lautenschläger[5]) findet an Stelle des Quecksilbersulfats Quecksilberchlorid Verwendung. Eine wesentliche Vereinfachung erreichen K. K. Koessler und M. T. Hanke[6]) durch Fällung der Hexonbasen mit Phosphorwolfram-

1) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **31**, 165 (1900, 01)
2) „ „ „ „ **38**, 39 (1903)
3) J. Phisiology, **27**, 418 (1901)
4) Biochem. Z., **264**, 131 (1933)
5) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **102**, 226 (1918)
6) J. biol. Chemistry, **43**, 527-42 (1920) **43**, 548-56 (1920)

säure. Dadurch erfolgt eine Abtrennung des bei der kolorimetrischen Bestimmung störenden Tyrosins. Der bei der Phosphorwolframsäurefällung der Hexonbasen entstehende, flockige Niederschlag, der Arginin, Lysin, Histidin und Histamin enthält, läßt sich leicht umfällen. Nach Hoppe-Seyler-Thierfelder[1]) verläuft der Arbeitsgang mit einigen Abänderungen von W. Diemair und H. Bickel[2]) folgendermaßen:

Das nach der Entfernung der Schwefelsäure als Bariumsulfat neutralisierte Hydrolysat wird mit 10 ccm konz. Salzsäure und 50 ccm 20%iger Phosphorwolframsäure versetzt. Der entstehende, sich aber sofort absetzende gelblich-weiße Niederschlag, der die Wolframate der Histobasen, sowie diejenigen von Arginin und Lysin enthält, wird auf dem Wasserbade durch Erwärmen und sanftes Rühren wieder in Lösung gebracht; man läßt abkühlen und zur vollständigen Wiederauffüllung 48 Stunden im Eisschrank bei + 2° C stehen. Hierauf wird der Niederschlag durch ein gehärtetes Filter abgesaugt und der verbleibende Niederschlag mit einer Lösung ausgewaschen, die auf 100 Teile Wasser 2,5 Teile konz. Salzsäure und 2,5 Teile Phosphorwolframsäure enthält. Die Waschflüssigkeit wird durch Aufbewahren in schmelzendem Eis auf 0° C gehalten und der Niederschlag auf dem Filter wiederholt mit Mengen von 10-15 ccm Waschflüssigkeit vorsichtig angerührt und langsam abgesaugt. Schließlich wird der die Basen enthaltende Niederschlag mit Hilfe eines Spatels vom Filter möglichst quantitativ in einen Scheidetrichter von 1000 ccm gebracht und der Rest mit 200-300 ccm Wasser übergespült. Es werden dann 10 ccm konz. Salzsäure hinzugefügt und mit soviel Amylalkohol-Aether (1:1 Gew. Proz.) geschüttelt, daß sieh der Niederschlag löst und eine zusammenhängende Schicht auf dem Wasser schwimmt. Die dazu notwendigen Mengen des Amylalkohol-Aether-Gemisches schwanken zwischen 100 und 300 ccm. Die Phosphorwolframsäure geht dabei in das Ausschüttelungsgemisch über. Die wässrige Schicht wird von der Amyl-alkoholisch-aether. getrennt und 3-mal mit je einem Viertel ihres Volumens Amylalkohol-Aether ausgeschüttelt. Zum Schluß werden die vereinigten Amylalkohol-Aether-Auszüge nochmals mit wenig Wasser ausgeschüttelt und dieses mit neuem Amylalkohol-Aether versetzt. Das Wasser wird mit dem Hauptteil der Basen vereinigt. Die Lösung soll frei sein von Phosphorwolframsäure, d. h. einige Tropfen in Barytwasser gebracht, dürfen keinen Niederschlag geben. Ist das erreicht, dann engt man im Vakuum zum Vertreiben der Salzsäure fast bis zur Trockne ein, spült den Rückstand in ein Meßkölbchen von 50 ccm und füllt bis zur Marke auf.

Die beschriebene Methode wurde in Vorversuchen angewandt, wobei sich aber zeigte, daß verhältnismäßig große Eiweißmengen notwendig waren, um einen verarbeitbaren Niederschlag zu erhalten.

1) Handbuch der Physiol. u. Pathol. Chem. Anal. S. 588, Verlag J. Springer, Berlin (1924)
2) Inaugural. Dissertation H. Bickel, München (1937)

Dies erwies sich vor allem bei den Leberextrakten als ungünstig. Ausserdem zeigt das Phosphorwolframat eine merkbare Eigenlöslichkeit, für die schon Koessler und Hanke eine empirische Korrektur einführen mußten. Die weitgehende Abhängigkeit der Phosphorwolframsäurefällung vom pH wird auch von R. A. Peters[1]) erwähnt. Aus diesen Gründen beschäftigt sich K. Lang[2]) mit der Verbesserung und Vereinfachung der Isolierungsmethode für Hexonbasen. Er benützt hierbei die Eigenschaft des Histidins, in schwach alkal. Milieu mit komplexen Merkuriverbindungen unlösliche Niederschläge zu geben; wichtig ist dabei, daß auch hier wie bei der Phosphorwolframsäure-Fällung Tyrosin in Lösung bleibt. Die erste Methode von K. Lang erschien daher uns besser geeignet, insbesondere nach Abänderung einiger Arbeitsgänge.

Zur Durchführung sind folgende Reagenzien notwendig:

1. Quecksilbermixtur nach K. Hinsberg und D. Laszlo[3]) 150 ccm gesättigte Sublimatlösung werden mit 70 g kristallisiertem Natriumacetat und 10 g Natriumchlorid versetzt.
2. 4%ige Natriumborat-Lösung
3. Gesättigte Sodalösung
4. n/1 Salzsäure
5. 5%ige Natriumcyanidlösung.

Die Bestimmung wird folgendermaßen ausgeführt:

Zunächst wird in dem jeweiligen Untersuchungsmaterial der Gesamtstickstoff bestimmt, um einen Rückschluß auf die anwesende Eiweißmenge ziehen zu können. Hierauf wird die etwa 150-200 mg Eiweiß entsprechende Hydrolysatmenge in einem Zentrifugenglas mit der gesättigten Sodalösung genau neutralisiert und dann mit einem Tropfen n/1 HCl gerade wieder angesäuert. Dann fügt man 5 ccm der Quecksilbermixtur und 10 ccm der Boratlösung hinzu und mischt gut durch. Wenn sich die entstehende Fällung zu sedimentieren beginnt, wird zentrifugiert, die obenstehende Flüssigkeit durch eine feine Glasfilternutsche (G. 4) gegossen; das Zentrifigat wird mit destilliertem Wasser aufgeschlämmt. Dieser Arbeitsgang wird noch 2 mal wiederholt.

Der von der überstehenden Flüssigkeit auf dem Glasfilter verbleibende Rückstand wird noch mehrmals mit Wasser nachgewaschen. Das Zentrifugat wird nun mit möglichst wenig Natriumcyanid-Lösung in Lösung gebracht. Zu diesem Zwecke wird es längere Zeit (etwa über Nacht) stehengelassen, wobei beobachtet wurde, daß sich immer ein schwarzer Quecksilberniederschlag bildet. Nun wird die Lösung quantitativ auf das Glasfilter gebracht und unter Umrühren durch Abnutschen von den Verunreinigungen befreit und das Filtrat schließlich auf 20 ccm aufgefüllt.

1) Biochemical J., **24**, 1852-55 (1930)
2) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **222**, 3 (1933)
3) Biochem. Z., **217**, 354 (1929)

2) Reinigung und Trennung der „Histobasen"

Zur weiteren Reinigung des Hexonbasengemisches und zur Entfernung etwa noch vorhandener höher molekularer Verbindungen, die sich gegebenenfalls störend auf die Kupplungsreaktion auswirken könnten, wurde in den Aufarbeitungsgang noch eine elektro-physikalische Reinigungsmethode eingeschaltet, und zwar die „Elektrodialyse".

Dieses Verfahren dient vor allem dem Zweck, aus kolloidalen Lösungen oder Suspensionen Elektrolyte zu entfernen und damit eine Reinigung der Kolloide herbeizuführen. Diese Methode wurde für solche Reinigungszwecke von Ch. Dhéré[1]) und W. Pauli[2]) ausgearbeitet. Nach W. Pauli versteht man unter „Elektro-dialyse" den elektrischen Transport von membrandurchgängigen Ionen durch kolloidundurchlässige Membranen zum Zwecke der Elektrolytbefreiung der von den Membranen umschlossenen Kolloide. Hiervon ist zu unterscheiden die „Elektrophorese", die in einer Überführung suspendierter oder kolloider Teilchen im elektrischen Feld besteht und die Elektroosmose", die den mit dem Stromdurchgang durch feste Diaphragmen verbundenen Flüssigkeitsdurchgang darstellt. Technisch ist die „Elektrodialyse" schon verhältnismäßig früh von B. Schwerin[3]) und später von H. W. Morse und G. W. Pirce[4]) mit Erfolg benützt worden.

Von den in Laboratorium üblichen Apparaten, die von den einzelnen Autoren je nach Verwendungszweck verschieden in der Form ausgebildet wurden, sei derjenige von W. Pauli[5]) beschrieben, da er sich grundsätzlich für die vorliegenden Zwecke am besten eignete, wenn auch zur quantitativen Bestimmung verschiedene Änderungen vorgenommen werden mußten.

Die aus Glas gefertigte Apparatur besteht aus 3 Kammern mit Einfülltubus, die durch 2 Membranen voneinander getrennt sind. Die beiden Außenkammern, in die mit Glasschliff je eine Platin-Netz-Elektrode eingeführt ist, haben zur Durchspülung der Kammer mit Wasser je ein Ein- und Ausflußrohr; die Kammern werden durch ein Gestänge zusammengehalten. In den beiden Außenzellen befindet sich Wasser, in der Mittelkammer die zu untersuchende Lösung. Der Vorgang beim Einschalten des Stromes (Gleichstrom) ist nun derselbe wie bei einer Elektrolyse. Die Kationen wandern zur Kathode, die Anionen zur Anode mit dem Unterschied, daß sie auf ihrem Wege

1) Kolloid. Z., **41**, 243, 315 (1927); Biochem. Z., **153**, 504 (1924)
2) Biochem. Z., **152**, 355 (1924); **187**, 403 (1927)
3) Vergl. P. H. Prausnitz u. J. Reitsstötter Elektrophorese, Elektroosmose, Elektrodialyse Verlag Th. Steinkopf, Leipzig (1931) S. 114
4) loc. cit. 3
5) Biochem. Z., **152**, 355 (1924)

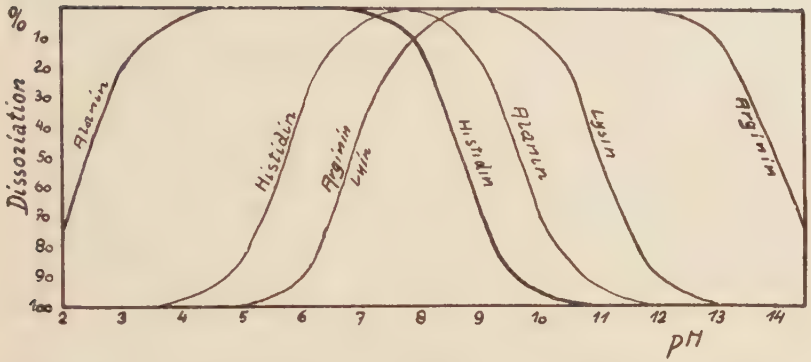
cine Membran passieren müssen. Zur Reinigung von Proteinsubstanzen soll nach Pauli die Größenordnung der Stromdichte 0,8—0,3 Milliamp./qcm nicht übersteigen. Während der etwa 48 Std. dauernden Dialyse kann die Klemmenspannung bis etwa 440 Volt ansteigen. Unter diesen Bedingungen ist auch die Verwendung von 2 neutralen (Pergament) oder 2 negativen (Kollodium) Membranen möglich. Bei Steigerung der Stromstärke, wie sie z. B. zur Verkürzung der Dialysezeit notwendig ist, besteht nun die Gefahr, daß eine starke Veränderung der pH der Mittelkammer erfolgt, was in manchen Fällen vermieden werden muß. Die pH-Änderung hat ihren Grund darin, daß der Wanderungsdrang der Kationen zur Kathode stärker ist als derjenige der Anionen zur Anode; das Ionengleichgewicht verschiebt sich zu Gunsten des Wasserstoffions, und die Reaktionslösung wird sauer.

Die Schwierigkeit, die Mittelkammer-Lösung neutral zu halten, behoben G. Ettisch, R. Bradfield und W. Ewig[1]), R. und H. St. Bradfield[2]) und V. Schönfeldt[3]) dadurch, daß sie geeignete Diaphragmenkombinationen wählten. Auch in den vorliegenden Vorversuchen wurden zunächst verschiedene Membranen verwendet, jedoch konnte schließlich auf dem einfacheren Weg der Alkalizugabe das Ziel erreicht werden. G. Ettisch und seine Mitarbeiter sowie auch V. G. Ruppel[4]), der sich mit der Elektrodialyse eingehend beschäftigt hat, weisen auf die Notwendigkeit des Rührens der Lösung in der Mittelkammer hin, um eine, den Fortgang der Dialyse erheblich störende Schichtenbildung zu vermeiden.

Die Beobachtung, daß bei der Elektrodialyse von Proteinhydrolysaten die Aminosäuren sich in drei Gruppen teilen lassen, stammt wahrscheinlich von K. Ikeda und S. Suzuki[5]). Die Stoffe mit vornehmlich saurem Charakter wandern in den Anodenraum, alle basischen Aminosäuren sind im Kathodenraum auffindbar und die, weder ausgesprochen sauren noch basischen Stoffe verbleiben im Mittelraum. G. L. Forster und C. L. A. Schmidt[6]) konnten so die Hexonbasen aus Proteinhydrolysaten freilegen. Gleichzeitig gelang ihnen durch Einhaltung eines pH = 7,5 die Trennung des Histidins vom Arginin und Lysin. Bei einem pH = 7,5 wandern Arginin und Lysin zur Kathode; Histidin, dessen iso-elektrischer Punkt bei diesem pH liegt, wandert nicht, wie auch im nachstehendem Diagramm zum Ausdruck kommt[7]).

1) Kolloid. Z., **45**, 141 (1928)
2) J. physic. Chem. **33**, 1724 (1929)
3) Wiss. Veröff. Siemens-Konz., **8**, II, 97 (1929)
4) P. H. Prausnitz und J. Reitstötter loc. cit.
5) aufgeführt in E. Gebauer-Fuelnegg und A. J. Kendall, Ber. dtsch. chem. Ges. **64**, 1067-72 (1931)
6) J. biol. Chemistry, **56**, 545 (1923)
7) G. L. Forster und C. L. A. Schmidt loc. cit.

Abbildung 1



Bei einem pH = 5,5 wandern die 3 Aminosäuren wieder gemeinsam zur Kathode, wie A.W. Keil und H. G. Schick[1]) bestätigen konnten. E. Gebauer-Fuelnegg und A. I. Kendall[2]) verwandten das Verfahren zur Trennung von Histidin und Histamin bzw. von Histidin und Cholin mit gutem Erfolg. Ebenso gelang auch die Isolierung von Histamin bzw. Cholin aus einem Gemisch mit Eiklar. Die Elektrodialyse wurde in einer Apparatur (eigener Angabe), die ähnlich der Pauli'schen aufgebaut war, durchgeführt. Die Membranen bestanden aus Pergament, was sich gut bewährte. Die Stromstärke betrug betrug 0,8-0,1 Amp. die Spannung 110 Volt. Das Verhältnis Histidin : Histamin war 250 mg : 25 mg.

In jüngster Zeit konnten R. Kuhn und P. Desnuelle[3]) unter Berücksichtigung der Arbeiten von G. Forster u. C. Schmidt[4]) und von G. I. Cox, H. King und C. P. Berg[5]) die Hexonbasen des gelben Fermentes mittels Elektrodialyse gewinnen. Sie verwendeten Cuprophanmembranen (J. P. Bamberg A. G.) und arbeiteten bei einer Stromstärke von 0,2-0,1 Amp. und einer Spannung von 220 Volt; während der Dialyse stand der Apparat zwecks Einhaltung einer niedrigen Temperatur in einem Bad mit schmelzendem Eis.

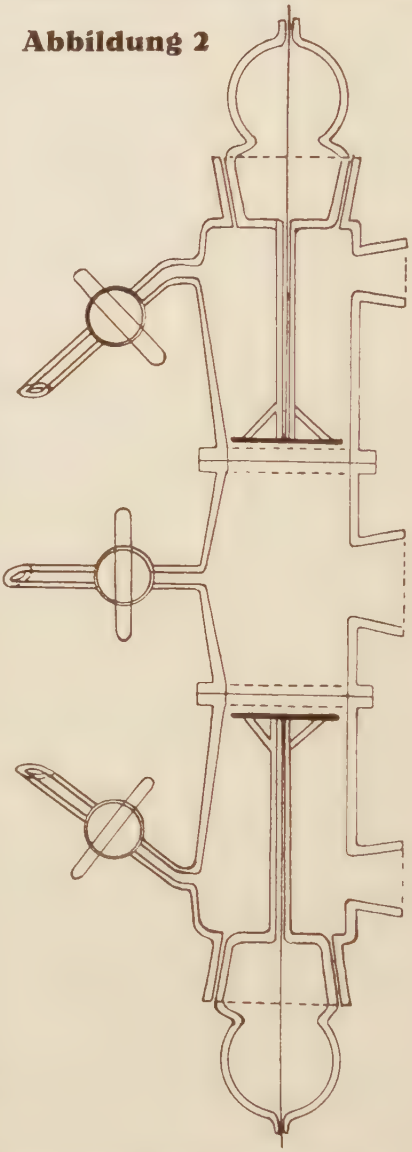
Im vorliegendem Fall mußte eine quantitative Erfassung der „Histobasen" angestrebt werden. Zu diesem Zwecke wurde eine Abänderung der Pauli'schen Apparatur vorgenommen.

Wie die Abb. 2 auf der nächsten Seite zeigt, besteht die Apparatur aus 3 Glaskammern; mit einer weiten Einfüllöffnung und einem Abflußhahn. Die Unterseite der beiden Aussenkammern ist etwas

1) Z. Biol., **88**, 153 (1928)
2) Ber. dtsch. chem. Ges., **64**, 1067-72 (1931)
3) Ber. dtsch. chem. Ges., **70**, 1913 (1937)
4) loc. cit.
5) J. biol. Chemistry, **81**, 755 (1929)

geneigt, um ein leichteres Zusammenfließen der Flüssigkeit zu ermöglichen. Die beiden mit Schliff eingeführten Elektroden sind bis auf das Platin-Netz vollständig in Glas eingeschmolzen, sodaß keine unnötige oder schwer abspülbare Berührungsfläche entsteht. Mit Hilfe runder Gummischeiben die leicht mit Vaseline eingefettet werden, ist ein gutes Abdichten möglich. Der Apparat wird durch ein geeignetes Gestänge fest zusammengehalten. Die Membranen bestehen aus Pergament.

Abbildung 2



In einer Reihe von Vorversuchen wurde bei reinen Histidin und Histaminlösungen die quantitative Entfernung aus der Mittelkammer innerhalb zwei Stunden festgestellt. Die Stromstärke wurde mit Hilfe eines Widerstandes unter 0,2 Amp. gehalten, die Spannung betrug 110 Volt. Die Hauptversuche wurden unter denselben Bedingungen vorgenommen, wobei je 5 ccm der Lösungen, die nach der Lang'schen Methode erhalten worden waren, Verwendung fanden. Ein Auswechseln der Kathoden- bzw. Anodenflüssigkeit war nicht notwendig. Die Überprüfung der Mittelkammer-Flüssigkeit ergab eine ganz schwache Färbung, die von der Eigenfärbung kaum zu unterscheiden war; die Anodenkammer-Lösung erwies sich frei von Histobasen. Die quantitativ in ein Kölbchen übergeführte Kathodenflüssigkeit wurde im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt und im Meßkölbchen auf 10 ccm aufgefüllt. Mit 5 ccm dieser Lösung wurde die kolorimetrische Bestimmung vorgenommenn. Eine Störung durch Cyanid und Qecksilber war hierbei nicht zu befürchten, da das Cyanid zur Anode wandert und Quecksilber nur ein sehr geringe Wanderuugstendenz zeigt. Eine Ver-

änderung des Farbtons bei Gegenwart dieser beiden Stoffe war von K. Lang[1]) sowie in eigenen Versuchen festgestellt worden.

Eine weitere Aufgabe war in Anlehnung an die Arbeiten von G. L. Forster und C. L. A. Schmidt[2]) sowie von E. Gebauer-Fuelnegg und A. J. Kendall[3]) eine quantitative Abtrennuug des Histidins vom Histamin durchzuführen. Zu diesem Zwecke mußte ein pH = 7,5 eingehalten werden, was durch Zugabe eines Gemisches von primärem Kaliumphosphat und sekundärem Natriumphosphat (1,6ccm einer Lösung von 9,078g KH_2PO_4-Ltr. und 8,4ccm einer Lösung von 10,763g-Ltr. K_2HPO_4) mit Hilfe einer Bürette gelang, wobei man sich durch Tüpfeln mit Lakmuspapier von der Richtigkeit des pH-Wertes überzeugte.

In einer Reihe von Versuchen wurde auch noch der Einfluß des Rührens und der Kohlensäure-Einfiußnahme verfolgt, die sich in einer starken Beschleunigung der Elektrodialyse äußerte. Dasselbe war bei erhöhter Stromstärke der Fall. Die damit verbundene Temperaturerhöhuug mußte jedoch möglichst vermieden werden, da die Membranen durchlässiger wurden. Durch Eintauchen der Apparatur in ein eisgekühltes Wasserbad konnte zwar dieser Nachteil behoben werden, was jedoch im Hinblick auf die in Aussicht genommenen Reihenuntersuchungen ziemlich umständlich war. Aus diesem Grunde war es auch notweudig, die Dialysezeit möglichst zu beschränken. Bei der vermeintlichen Ineinflußnahme der Puffersubstanz auf die Abtrennung des Histamins und der dadurch bedingten Erschwerung der Neutralisation der Mittelraumlösung, wurde zur Behebung der Unzulänglichkeit 10%ige Bariumhydroxydlösung mit gutem Erfolg angewandt. Um das lästige Tüpfeln zu umgehen, wurde der Mischindikator Bromthymolblau-Phenolrot zugesetzt, der bei etwa pH = 7,5 einen deutlich erkennbaren Umschlag von Rot nach Grün zeigt und selbst während der Elektrodialyse unverändert blieb[4]). Unter Einhaltung dieser Vorbedingungen gelang schließlich die quantitative Trennung von Histidin und Histamin.

3) Verbesserung des kolorimetischen Bestimmungsverfahrens.

Mit den nachfolgenden Versuchen solltc die in einer Gemeinschaftsarbeit von B. Bleyer, W. Diemair, F. Fischler und K. Täufel[5]) abgeänderte, zur quantitativen Bestimmung von Histidin

1) loc. cit.
2) loc. cit.
3) loc. cit.
4) Die Indikatoren Alizarin, Phenolphtalein, Bromthymolblau, Neutralrot-Methylenblau, Kresolrot-Thymolblau bewährten sich nicht.
5) Biochem. Z., **286**, 408 (1936); **289**, 27 (1936); **292**, 301 (1937)

und Histamin dienende Pauly'sche Reaktion noch weiterhin in analytischer Hinsicht untersucht und verbessert werden. Die in genannter Arbeit angewandte Arbeitsweise war folgende:

Arbeitsgang:

1 ccm alkoholische ½%ige p-Nitranilinlösung wird mit 1 ccm ½%iger Natriumnitritlösung versetzt, unter Eiskühlung ½ ccm Salzsäure (1 : 1) zugegeben und solange geschüttelt, bis sich die Flüssigkeit entfärbt. Dann gibt man zu dieser Lösung die zu untersuchende Flüssigkeit (5 ccm der Extraktlösung, hydrolysiert) kühlt nochmals durch kurzes Einstellen des Reagenzglases in Eis und alkalisiert mit 20%iger Natriumkarbonatlösung, bis der Farbstoff ganz ausgefällt ist. Hierauf wird das Reaktionsgemisch in einem kleinen Schütteltrichter 2-3 mal mit einem Gemisch Butylalkohol : Pyridin (9:1) ausgeschüttelt. Dabei geht der Farbstoff ganz in das Lösungsmittel über.

Bei der Aufstellung einer Eichkurve mit Lösungen bekannten Histidin- bzw. Histamingehaltes traten immer noch verhältnismäßig starke Streuungen unter den einzelnen Kolorimeterwerten ein. Dies führte zu der Vermutung, daß die Ursache der wechselnden Werte auf die ungleichmäßige Einhaltung der Versuchsbedingungen zurückzuführen sei. Eine Überprüfung der Eichkurven bzw. Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Zeit der Zugabe des Alkalisierungsmittels zur Diazoniumlösung ergab folgendes Bild:

Tabelle 2

Versuche	Histidin in mg in 5 ccm	Dauer der Zeit zwischen Zugabe des Diazoniumsalzes und Alkalisierung in Minuten	Absorptionswerte %
1	0,5	0	45
2	0,5	5	41
3	0,5	30	38

Obwohl die Diazolösung ständig unter Eiskühlung gehalten wurde, fand anscheinend eine Zersetzung statt. Somit mußte also die Alkalisierung der Diazolösung kurz nach der Diazotierung erfolgen; der Einhaltung einer genau begrenzten Kühlungszeit sowie der Verwendung immer gleicher Mengen des Ausschüttelungsgemisches wurde ebenfalls Beachtung geschenkt.

Trotz der genauen Festlegung der äußeren Bedingungen in einer Reihe von Versuchen waren die Ergebnisse wenig befriedigend.

Durch die chromatographische Adsorptionsanalyse konnte nun bewiesen werden, daß bei der Kupplung von Imidazolkörpern mit

dem Diazoniumsalz des p-Nitranilins immer mehrere Farbkomponenten nebeneinander entstehen. W. Diemair und H. Fox[1]) konnten zeigen, daß die wechselnde Zusammensetzung der entstehenden Farbstoffgemische vor allem durch die Beteiligung der aliphatischen Aminogruppe des Histidins bzw. Histamins bedingt ist; darauf weist auch die Tatsache hin, daß im Gegensatz zur normalen Reaktion bei Festlegung der störenden Aminogruppe z. B. durch den Benzoyl-Rest schön kristallisierende Farbstoffe erhalten werden.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde nun versucht, die Benzoylierung auch beim Nachweis der Histobasen zu benutzen. Es wurde dabei in der Weise vorgegangen, daß zu je 5 ccm der alkalisierten Histidin- bzw. Histaminlösung (Konzentration 0,2/1000 ccm) 1 Tropfen Benzoylchlorid, gelöst in etwas Benzol, hinzugegeben und kräftig umgeschüttelt wurde.

Bei Histidin trat eine schwache Vertiefung der Färbung, vor allem aber eine Veränderung des Farbtons von Bräunlichrot nach Kirschrot ein. Der Farbton des benzoylierten Histidins zeigte große Ähnlichkeit mit dem des reinen Histamins, was wiederum ein Hinweis auf die Beteiligung der Aminogruppe in der Seitenkette ist. Im Gegensatz zum benzoylierten Histidin bewirkte die Benzoylierung des Histamins eine starke Verminderung der Farbtiefe, deren Ursache wohl in der teilweisen Zerstörung des Imidazolringes zu suchen ist. Daß diese Zerstörung bei der Benzoylierung von Histamin nach Schotten-Baumann unter Bildung von Tribenzoylbutentriamin eintritt, wurde schon von A. Windaus und W. Vogt[2]) festgestellt. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sich auch durch Festlegung der aliphatischen Aminogruppe keine besseren Ergebnisse erzielen lassen, und daß die Benzoylierung bei einer quantitativen Bestimmung keinen Vorteil bietet.

Die Untersuchung von W. Diemair und H. Fox zeigten weiterhin, daß das pH der Lösung auf die Kupplungsreaktion einen Einfluß ausübt. Dies konnte an Hand zahlreicher Versuche bewiesen werden. Auch die angewandte Diazotierungsmethode erschien deshalb unzweckmäßig, weil gleichprozentige Lösungen verwendet wurden, wodurch ein Überschuß an salpetriger Säure entstand. Dieser kann sich aus später noch zu erörternden Gründen störend auf die Reaktion auswirken. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen erwies sich eine Umarbeitung der Bestimmungsmethode als notwendig. Für die Diazotierung wurden zwei Lösungen hergestellt:

Diazolösung I: 1,0 g p-Nitranilin und 5 g konz. Salzsäure in 50 ccm Alkohol.

Diazolösung II: 0,5 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser.

1) W. Diemair u. H. Fox, Biochem. Z., 298, 38 (1938)
2) Ber. dtsch. chem. Ges., 40, 3691 (1907)

In einem 50 ccm Erlenmeyer-Kölbchen wurden nun 5 ccm Lösung I und 10 ccm Lösung II miteinander unter Eiskühlung gemischt und die Mischung vor Gebrauch filtriert. 2 ccm dieser Diazoniumsalzlösung werden in einem kleinen, etwa 100 ccm fassenden Scheidetrichter unter ständigem Umschütteln zu einer Mischung von 5 ccm Histidin- bzw. Histaminlösung und 5 ccm gesättigter Natriumkarbonatlösung gegeben. Nach 2 Minuten wurde mit 10 ccm Butylalkohol: Pyridin-Gemisch ausgeschüttelt und die Ausschüttelung noch 3 mal wiederholt.

Zunächst mußte der Einfluß der pH auf die Farbtiefe festgestellt werden.

Tabelle 3

Versuche	Histidin in mg in 5 ccm	Zugesetzte Menge gesättigter Natriumkarbonatlösung in ccm	Absorptionswerte %
1	1,0	0,5	92,5
2	1,0	2,0	77,0
3	1,0	5,0	69,0
4	1,0	10,0	50,0

Aus der Tabelle 3 geht die starke pH-Abhängigkeit der Diazotierung und damit der Farbstoffbildung hervor; überraschend ist, daß durch Erhöhung der Alkalimenge ein starkes Absinken der Absorptionswerte erfolgt. Der Farbton in den Versuchen 1 und 2 war weniger rein als in den Versuchen 3 und 4.

Eine weitere Versuchsreihe diente zur Ermittlung der Zeitabhängigkeit der Reaktion vom Augenblick der Ausschüttelung ab und in Abhängigkeit von der Menge des zum Ausschütteln verwendeten Lösungsmittels. Es wurden zur Alkalisierung 5 ccm gesättigte Natriumkarbonatlösung verwendet.

Tabelle 4

Versuche	Histidin in mg in 5 ccm	Dauer der Zeit zwischen Alkalisierung und Ausschüttelung in Minuten	Absorptionswerte %
1	1,0	2	61,5
2	1,0	5	64,0
3	1,0	15	66,5
4	1,0	30	66,5

Die Versuche zeigen, daß die Farbintensität mit der Wartezeit allmählich ansteigt, weiterhin ist es wichtig, wiederholt und zwar mindestens 3 mal auszuschütteln, um gleichmäßige Absorptionswerte zu erhalten. Die Chromatogramme zeigen auch hier auf, daß der gebildete Farbstoff aus mehreren Komponenten besteht.

Wenn auch unter Einhaltung der angegebenen Bedingungen eine verhältnismäßig gute Übereinstimmung der Werte erreicht werden konnte, so waren doch Ausfälle zu beobachten, Störungen, die möglicherweise in der Verwendung des p-Nitranilins zu suchen waren.

An neuen Kupplungspartnern, die beständigere und eindeutige Kupplungsprodukte liefern konnten, wurden überprüft:

2-Amido-Anthrachinon,
2,4 Dichloranilin und
p-Toluidin,

diese zeigten nach p-Nitranilin die stärkste Farbintensität; doch mußten 2-Amido-Anthrachinon seiner geringen Löslichkeit, 2,4 Dichloranilin seiner Unbeständigkeit halber ausscheiden. Dagegen erwies sich p-Toluidin gut geeignet: das Kupplungsprodukt war leicht löslich, beständig, tief in der Farbe, das Chromatogramm deutete auf die Bildung von nur 2 Farbstoffen hin.

In den folgenden Versuchen konnten nun die früheren Erfahrungen verwertet werden, nämlich:

Die Berücksichtigung der Einwirkung molekularer Mengen bei der Diazotierung, die Ausführung der Diazotierung unter gleichen, genau einzuhaltenden Bedingungen, insbesondere der pH, ferner der Zeit zwischen Kupplung und Ausschüttelung und der Konzentration des Ausschüttelungsgemisches.

Das Diazoreagens wurde in üblicher Weise (vgl. p-Nitranilin) hergestellt, und zwar wurden als Diazolösung I: 1,5 g p-Toluidin und 5 g konz. Salzsäure in 100 ccm Alkohol, als Diazolösung II: 0,5 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser gelöst.

Tabelle 5

Versuche	Histidin in mg in 5 ccm	Zugesetzte gesättigte Na_2OO_3-Lösung in ccm	Absorptionswerte %
1	1,0	0,5	20,0
2	1,0	2,0	54,0
3	1,0	5,0	56,0
4	1,0	10,0	56,4

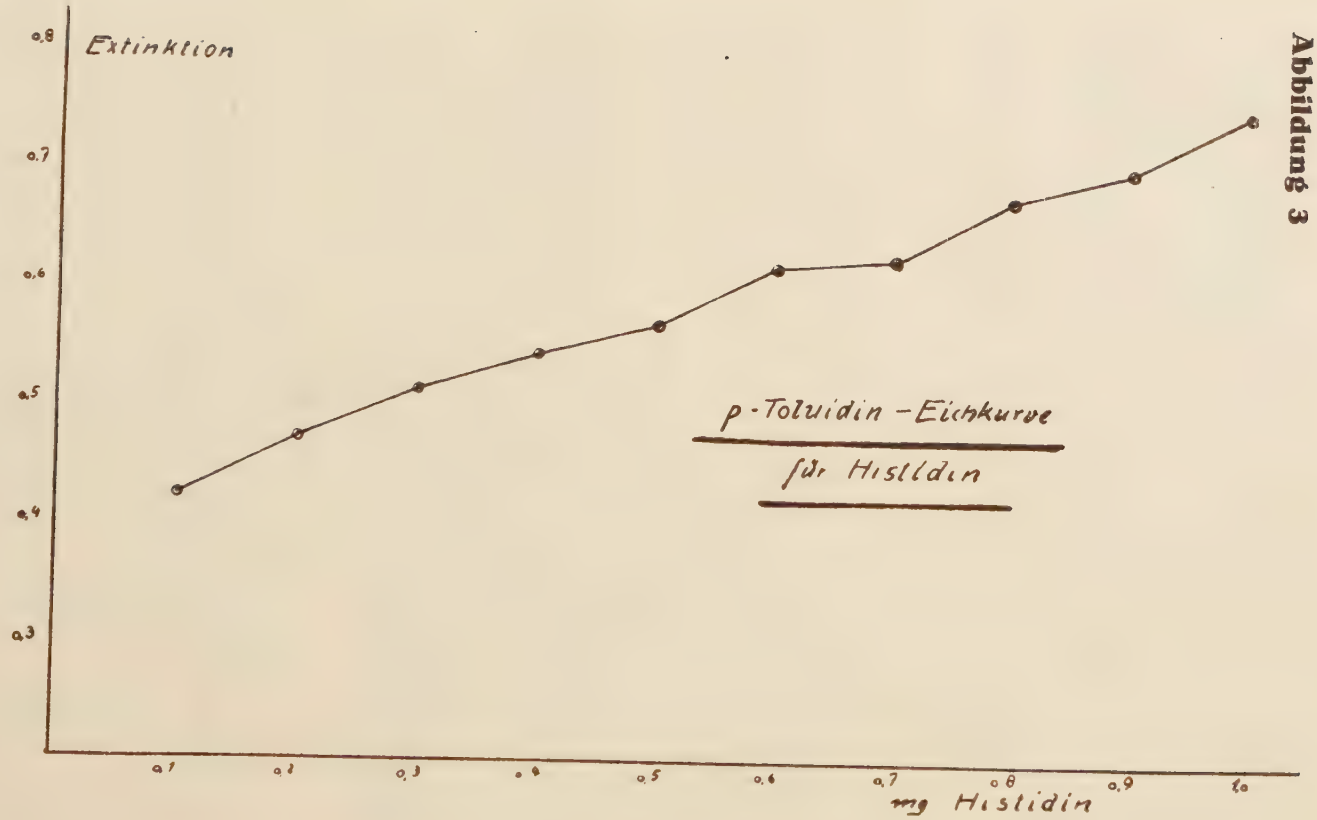

Extinktion
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
p-Toluidin-Eichkurve
für Histidin
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
mg Histidin

Abbildung 3

Tabelle 6

Versuche	Histidin in mg in 5 ccm	Dauer der Zeit zwischen Kupplung und Ausschüttelung in Minuten	Absorptionswerte %
1	1,0	2	46,0
2	1,0	5	56,0
3	1,0	10	56,0
4	1,0	30	55,0

Im Gegensatz zu den Versuchen mit p-Nitranilin zeigt Tabelle 5 ein Ansteigen der Werte bei Erhöhung der Alkalimenge; der Zeiteinfluß macht sich in etwa der gleichen Richtung bemerkbar, was auch aus der Eichkurve hervorgeht.

Zur graphischen Darstellung wurde auf der Ordinate die Extinktion, auf der Abzisse die Histidinmengen in mg aufgetragen, da auf diese Weise eine lineare Funktion entsteht, die etwaige Fehler besser erkennen läßt. Als störend fiel die starke Eigenfärbung der Blindversuche auf, die überraschender Weise auch keine konstanten Kolorimeter-Werte lieferte.

Blindversuch:

Zu je 5ccm gesättigter Natriumkarbonatlösung wurden tropfenweise unter Umschütteln 2ccm der Diazoniumsalzlösung hinzugegeben; nach Ablauf von 5 Minuten wurde in üblicher Weise 3 mal ausgeschüttelt mit folgendem Ergebnis:

Versuchslösung 1 : 22,1 %,
2 : 17,9 %,
3 : 20,1 %.

3 Versuche mit gleicher Histidinkonzentration (1,0 mg) unter gleichen Bedingungen zeigten dagegen auffallende Übereinstimmuug:

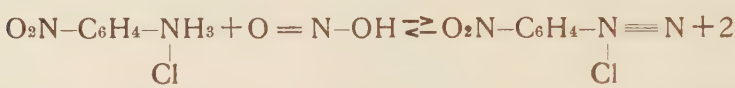
Versuchslösung 1 : 76,2 %,
2 : 76,1 %,
3 : 76,2 %.

Nach längerem Stehenlassen der Diazolösungen in Eis, (½, 1 und 4 Stunden) wurden bedeutend höhere Werte bei gleicher Histidinkonzentration erhalten. Abschließend wurde noch festgestellt, daß zur Kupplung von 1,0 mg Histidin 1 ccm Diazolösung ausreicht.

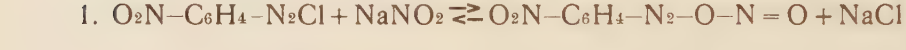
Zusammenfassend geht aus diesen Versuchen hervor, daß trotz Einhaltung genauester Versuchsbedingungen die Streuungen noch erheblich sind. Nachdem aber alle Fehlerquellen nahezu ausgeschaltet

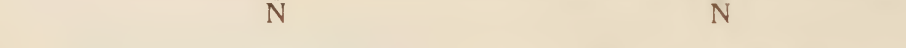
bzw. berücksichtigt waren, mußte die Zusammensetzung der Diazoniumsalzlösung selbst für die wenig befriedigenden Ergebnisse verantwortlich gemacht werden.

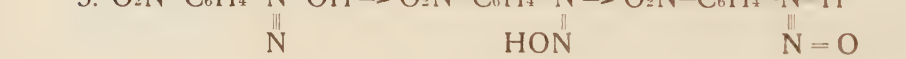
M. T. Hanke und K. K. Koessler[1]), die eine sehr gebräuchliche, auf der „Pauly'schen Reaktion" beruhende Methode zur Imidazolbestimmung ausgearbeitet haben, erwähnen in ihrer Arbeit, daß das Alkalisierungsmittel dem Diazoreagens vor der Kupplung zugegeben werden müßte und begründen diese Maßnahme mit der folgenden Vorstellung über den Reaktions-Ablauf bei der Kupplung, die wohl auch Gültigkeit für die Kupplueg von p-Nitroanilin an Stelle von Sulfanilsäure haben dürfte. Die Diazotierung verläuft demnach folgendermaßen:



Ein Überschuß von Natriumnitrit in der Diazoniumsalzlösung seheint sich so auszuwirken:







Hanke und Koessler sind der Ansicht, daß nicht das Diazohydrat sondern die Syn-Diazosäure oder das isomere Nitrosamin als Kupplungspartner zu gelten haben. Nach obigen Gleichungen würde eine derartige Diazolösung immer wechselnde Mengen von salpetriger Säure enthalten, da immer ein Teil derselben in Form des Anhydrids entweicht. Bei Stoffen mit aliphatischen Aminogruppen, wie z. B. beim Histidin werden immer wechselnde Mengen dieser Aminogruppe durch Hydroxyl ersetzt; die durch die Hydroxylverbindungen jedoch hervorgerufenen Färbungen sind anderer Art als diejenigen der Aminoverbindungen. Aus diesem Grunde können bei einer bestimmten Histidinkonzentration nicht immer gleich starke Farbstoffbildungen eintreten, da der Desaminierungsgrad in jedem Fall verschieden ist. Diese Fehlerquelle wurde nun von Hanke und Koessler dadurch ausgeschaltet, daß die Zugabe zur Diazonium-

1) J. biol. Chemistry, **39**, 497 (1919)

salzlösung vor der Kupplung erfolgte. Damit wird die freie Salpetrige Säure sofort neutralisiert und eine Abspaltung der aliphatischen Aminogruppe verhindert. In der Gleichung

$$O_2N-C_6H_4-\underset{\underset{N}{\|}}{N}-O-N=O + H_2O \rightleftarrows O_2N\ C_6H_4\ \underset{\underset{N}{\|}}{N}-OH + HNO_2$$

verlegt sich das Gleichgewicht auf die Seite der Bildung von Diazohydrat, das anderseits wiederum die aktiven Kupplungspartner liefert. Durch Verwendung des milden Natriumkarbonats konnte die Bildung von Syn- bzw. Antidiazotat vermieden werden.

Trotz der Verwendung aequimolekularer Mengen bei dem von uns durchgeführten Verfahren scheint, entsprechend der oben genannten Reaktionsgleichung der Reaktionsverlauf ein ähnlicher zu sein. Zur Behebung der Störung wurde aber nicht nach Hanke und Koessler (Änderung der Alkalisierung) verfahren, sondern die Diazotierung des p-Nitroanilins mit Nitrit, also auch die Bildung des p-Nitrophenylantidiazotats in einem besonderen Arbeitsgang durchgeführt. Durch Alkalieinwirkung auf Diazoniumsalze in der Wärme entstehen bekanntlich Antidiazotate, die durch überschüssige Mineralsäure wieder quantitativ in die entsprechenden Diazoniumsalze umgelagert werden. Bei Verwendung von Antidiazotat, das sich leicht in reiner Form gewinnen läßt, ist damit jeder Überschuß an salpetriger Säure oder von p-Nitranilin ausgeschlossen und eine in jedem Falle einheitliche Zusammensetzung der Diazoniumsalzlösung gewährleistet. Die Darstellung des p-Nitrophenylantidiazotats ist einfach und wird in guter Ausbeute nach L. Gattermann[1]) gurchgeführt.

Herstellung des Antidiazotates:

14 g p-Nitranilin ($^1/_{10}$ Mol) werden in der Hitze in 60 ccm Salzsäure (30 ccm konz. und 30 ccm Wasser) gelöst. Die Lösung gießt man auf 80 g Eis, das sich in einem kleinen Filtrierstutzen befindet. Man diazotiert nun bei 5—10° mit der Lösung von 8 g Natriumnitrit in 20 ccm Wasser, die man unter kräftigem Umrühren auf einmal hinzufügt und läßt, nachdem man sich von der Vollendung der Reaktion überzeugt hat, die Diazoniumsalzlösung unter Umrühren in die auf 40—50° erwärmte Mischung von 400 ccm etwa 4n-Natronlauge einfließen. Während des Erkaltens kommt das Antidiazotat in schönen goldgelben Blättchen zur Abscheidung. Nach mehrstündigem Stehen saugt man das Salz ab und wäscht es mit gesättigter Kochsalzlösung. Es ist nach dem Trocknen auf Ton beliebig lang haltbar und kann durch Auflösen in Alkohol von 60° und Verdunstenlassen der filtrierten Lösung von noch anhaftendem Kochsalz befreit werden. Die Ausbeute beträgt gut 18 g.

1) „Die Praxis d. organ. Chemikers" S. 276, de Gruyter-Verlag, Berlin, (1933)

Die Diazoniumsalzlösung wird nun folgendermaßen hergestellt: 0,5 g des anti-Diazotats werden in 50 ccm Wasser unter Zusatz von 1 ccm 33 %iger Natronlauge gelöst (Stabilisierung des anti-Diazotats). 10 ccm dieser Lösung läßt man dann unter Eiskühlung zu 2 ccm 25 %iger Salzsäure fließen. Nach kurzem Stehenlassen wird ein evtl. ausgefallener Niederschlag abfiltriert und das klare Filtrat zur Kupplung verwandt.

Diese wird folgendermaßen durchgeführt:

Kupplung:

In einem kleinen Scheidetrichter (etwa 50 ccm fassend) werden 5 ccm der Histidin- bzw. Histaminlösung mit 2 ccm gesättigter Natriumkarbonatlösung versetzt; zu dieser Mischung fügt man 2 ccm der klaren Diazoniumsalzlösung unter ständigem Umschütteln hinzu und schüttelt nach 3 Minuten 3 mal mit je 10 ccm Butylalkohol aus.

Die kolorimetrische Auswertung erfolgt wie üblich im Lang'schen Absolutkolorimeter unter Verwendung von 100 ccm Küvetten.

Mit Lösungen bekannten Histidin- bzw. Histamingehaltes wurden nun folgende Eichkurven aufgestellt. Die erhaltenen Zahlenwerte sind in nachfolgender Tabelle 7 zusammengestellt.

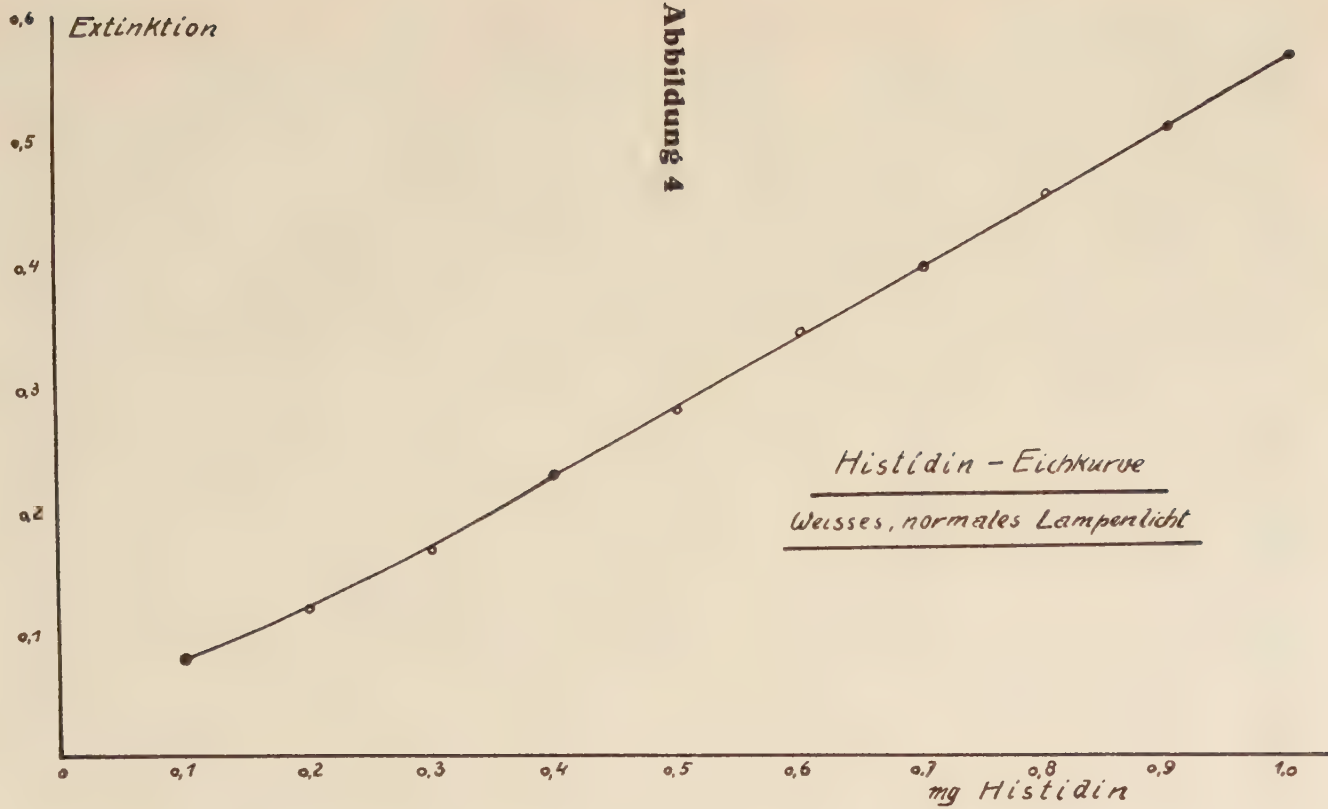
Tabelle 7

Eichkurvenwerte für Histidin und Histamin

Histidin mg in 5 ccm Lösung	Extinktion	Histamin mg in 5 ccm Lösung	Extintion (Rotfilter)
1,0	0,567	1,0	0,205
0,9	0,509	0,9	0,188
0,8	0,460	0,8	0,172
0,7	0,399	0,7	0,159
0,6	0,347	0,6	0,136
0,5	0,280	0,5	0,119
0,4	0,229	0,4	0,105
0,3	0,167	0,3	0,085
0,2	0,119	0,2	0,060
0,1	0,079	0,1	0,040

In den graphischen Darsellungen (Abb. 4 und 5) ist auf der Abszisse der Gehalt an Histidin bzw. Histamin auf der Ordinate die Extinktion aufgetragen.

Abbildung 4


Extinktion
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
0,6
0,7
0,8
0,9
1,0
mg Histidin
Histidin - Eichkurve
Weisses, normales Lampenlicht

4. Nachweis u. Bestimmung von „Histobasen", Histidin und Histamin.

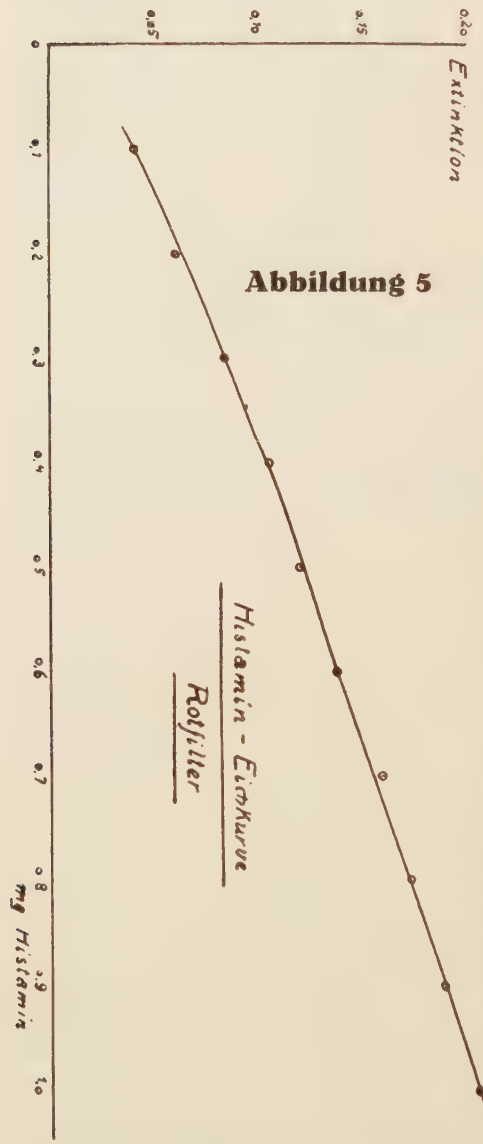


Abbildung 5

Nach dem so ausgearbeiteten Verfahren wurden folgende tierische und pflanzliche Stoffe auf ihren Gehalt an Histidin und Histamin überprüft.

a) Fleisch- und Fleischerzeugnisse,
b) Fisch
c) Getreide und Getreideerzeugnisse, Kaffee,
d) Leberextrakte.

Fleisch.

Untersucht wurde Ochsenfleisch: roh, gekocht, gebraten.

Arbeitsgang:

Die Zubereitung erfolgte so, daß 150 g mageres Ochsenfleisch in 400 ccm in kaltes Wasser eingelegt und 1 Stunde offen zum Sieden erhitzt wurden. Das ausgekochte Fleisch wurde im Fleischwolf zerkleinert, u. der erhaltene Fleischbrei (86 g) hydrolysiert. In der, in bekannter Weise hydrolysierten Fleischlösung wurde das Gesamt-Protein nach Kjeldahl bestimmt. Hierauf erfolgte die Ermittlung des „Histobasen"-Anteils. Zu diesem Zwecke wurden solche Mengen an Hydrolysat verwendet, die einer Gesamtmenge von 150-200 mg Gesamt-Protein entsprachen. Dazu waren durchschnittlich 1-2 ccm Hydrolsat erforderlich. Diese Menge wurde nach K. Lang (siehe Seite 18) aufgearbeitet, und die anfallende

Hexonbasen-Lösung, die cyanid- und quecksilberhaltig ist, elektrodialysiert. Daneben wurde mit Hilfe der Elektrodialyse eine Trennung des Histidins von Histamin durchgeführt, und diese beiden Stoffgruppen nebeneinander quantitativ mit Hilfe der Diazoreaktion bestimmt. In gleicher Weise wurde auch gebratenes Fleisch untersucht, das in der Weise zubereitet wurde, daß 100 g Rohfleisch im eigenen Saft so lange gedünstet wurde, bis eine einheitliche braune Kruste sich auf beiden Seiten des Fleisches gebildet hatte. Das gebratene Fleisch wurde wie das gekochte Fleisch weiter behandelt.

Tabelle 8

Untersuchte Stoffe	Histobasen	Histidin	Histamin	Summe Histidin + Histamin
	g in 100 g Trockensubstanz			
Fleisch				
Rohfleisch	3,76	3,54	1,42	4,96
Gekochtes Fleisch	4,17	2,40	0,31	2,71
Gebratenes Fleisch	5,46	3,37	0,65	4,02

Die in der vorstehenden Tabelle zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, dass durch die Zubereitung des Fleisches Veränderungen eintreten, die in einer Zunahme des „Histobasengehaltes“ zum Ausdruck kommen.

Während im ungekochten Fleisch ein „Histobasen“gehalt von 3,76 g in 100 g Ausgangsmaterial (Trockensubstanz) festzustellen sind, bewegt sich die Zunahme bei gekochtem Fleisch in der Grössenordnung von 4,17 g, bei gebratenem Fleisch von 5,46 g: d. h. es ist eine Erhöhung der „Histobasen“ um 10,9% bzw. 45,2% eingetreten.

Durch Anwendung von Wärme tritt, wie A. Bickel, C.V. Eweyk und W. Tennenbaum[1]) bereits beim Erhitzen von Eiern haben feststellen können, eine Freilegung von „Histobasen“ ein, wobei aber bei den vorliegenden Untersuchungen noch nicht entschieden war, ob es sich hier um eine Zunahme von Histidin oder Histamin handelt. C. V. Eweyk und W. Tennenbaum konnten eine Vermehrung des Histaminanteils, also eine Dekarboxylierung des vorhandenen Histidins feststellen. Im vorliegendem Falle sind die „Histobasen“werte so auffallend — dies gilt insbesondere für den „Histobasen“gehalt gebratenen Fleisches — dass bei dieser Zubereitungsart, also bei der Anwendung von Temperaturen um 150-175°, nicht nur Histidin-haltige

1) loc. cit.

Eiweißstoffe aufgespalten sondern hier wiederum die Karboxyl-Gruppe des freigelegten Histidin-Eiweisses abgespalten werdeu können. Nur so ist die deutliche Steigerung des „Histobasen"-Wertes erklärbar. Inwieweit aber zusätzlich andere, aus den Muskel-Proteinen stammende, denaturierte Eiweiss-Abbauprodukte mit von der Diazoreaktion erfasst werden, lässt sich bei dem Gemisch verschiedenster Eiweiss-Substanzen nicht mit Sicherheit aussagen. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass bereits präformiert vorliegende Aminosäuren, z. B. Alanin, Lysin, Arginin sowie Purinderivate an der Reaktion beteiligt sind, aber nicht in dem Masse, wie es in den Untersuchungsergebnissen zum Ausdruck kommt, denn an Hand orientierender Versuche reagieren diese Stoffe bei der Kupplung äusserst schwach. Dagegeu konnte durch eigene Versuche der Nachweis geführt werden, dass Carnosin, also ß-Alanyl-Histidin, eine kräftige Kupplungstendenz zeigt, wie auch O. Fürth und Th. Hryntschak[1]), W. M. Clifford[2]), G. Hunter[3]) und F. M. Kuen[4]) bei der Untersuchung des Säugetiermuskels dartun konnten. Die Möglichkeit der Mitbeteiligung dieses Stoffes, sowie von Xanthin und Hypoxanthin ist, wie auch aus den Untersuchungen von Hunter hervorgeht, nicht ausgeschlossen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung von F. M. Kuen, der in geräuchertem Fleisch einen Stoff mit kräftiger Diazoreaktion feststellen konnte. Da bei der Heissräucherung in Räucheröfen immerhin Temperaturen von 70-100° C herrschen, so kann es sich auch hier um eine thermische Zersetzung von Histidin-haltigem Eiweiss, ähnlich wie in unserem Falle, handeln.

Die Erhöhung des „Histobasen"gehaltes in gekochtem Fleisch ist geringer aber immerhin noch deutlich, ein Beweis dafür, dass in diesem Falle Veränderungen im Eiweiß durch Hitzeeinfluß aber in nicht so weitgehendem Maße jedoch in der gleichen Richtung einsetzen.

Zur Feststellung der Verteilung des Histidin- und Histamin-Anteils gegenüber der gesamten „Histobasen"menge wurde wie bei der Bestimmung des „Histobasen"gehaltes vorgegangen, diesmal unter Einhaltung der ph = 7,5 bei der Elektrodialyse.

Die ermittelten Histidin- und Histamin-Werte gehen überraschender Weise bei Rohfleisch kein eindeutiges Bild, da sich hier aus der Summe der Werte ein Mehrbetrag von 1,20 % ergibt. Anders ist dies bei gekochtem und gebratenem Fleisch, wo die Summenwerte für Histamin und Histidin mit einem Betrag von 1,46 g (gekochtes Fleisch) und 1,44 g (gebratenes Fleisch) unterhalb des Gesamtwertes liegen. Daraus geht zunächst hervor, daß ein gewisser

1) Biochem. Z., **64**, 172
2) Biochemical J., **15**, 400 (1921); **15**, 725 (1921); **16**, 341 (1922)
3) Biochemical J., **15**, 689 (1921); **16**, 640 (1922)
4) Biochem. Z., **189**, 61 - 80 (1927)

Stoffanteil, der wohl die Diazoreaktion gibt, nicht zur Gruppe der Histidinabkömmlinge zählt. Größenordnungsgemäß läßt sich eine Übereinstimmung dieser „vermeintlichen Histobasen" feststellen. Auffallend ist sowohl beim gekochten wie beim gebratenen Fleisch die stärkere Beteiligung des Histidins an der Reaktion und hier wieder das Überwiegen desselben beim gebrateuen Fleisch gegenüber dem gekochten. Diese Beobachtung deckt sich mit der Feststellung bezügl. des „Histobasen"-Gehaltes. In gleicher Richtung verläuft die Beteiligung von Histamin, wo wiederum mengenmässig das gebratene Fleisch mit einem Wert von 0,65g das gekochte mit einem Wert von 0,31g übertrifft.

Die Elektrodialyse gibt also mit Sicherheit darüber Aufschluss, dass durch die Zubereitung Stoffe mit histidin-ähnlichem Charakter gebildet oder freigelegt werden, die mit Hilfe der Pauly'schen Diazoreaktion als Histidin und Histamin deutbar sind.

Fleischerzeugnisse.

Zur Untersuchung gelangten die Fleischerzeugnisse: Liebigs Fleischextrakt, Maggi-Fleischbrühe und der Hefeextrakt Marmite.

Sie wurden in der Weise aufgearbeitet, dass je 5g in üblicher Weise mit Salzsäure hydrolysiert wurden. Die Hydrolysate wurden in bekannter Weise weiterbehandelt, auf ihren Gehalt an „Gesamthistobasen" geprüft und deren Trennung in Histidin und Histamin durchgeführt.

Tabelle 9

Untersuchte Stoffe	Histobasen	Histidin	Histamin	Summe Histidin + Histamin
	g in 100g lufttrockener Substanz			
Fleischerzeugnisse				
Liebigs Fleischextrakt	5,69	2,84	0,26	3,10
Maggi-Fleischbrühe	0,84	0,42	0,24	0,66
Marmite(Hefeextrakt)	2,07	1,12	0,62	1,74

In der oben stehenden Tabelle fällt bei Liebigs-Fleischextrakt der hohe „Histobasen"-Gehalt auf, der grössenordnungsgemäss nahezu mit demjenigen von gebratenem Fleisch übereinstimmt. Die Elektrodialyse lässt aber erkennen, dass hier der Histidin-Gehalt unterhalb demjenigen von gebratenem Fleisch liegt, mengenmässig aber auch nahe an diesen herankommt. Der Histamin-Gehalt ist wesentlich

geringer. Die im Vorangegangenen gemachte Feststellung, dass die Summe aus Histidin + Histamin — hier mit 3,10g — unterhalb des „Histobasen"wertes liegt, deutet darauf hin, dass relativ grosse Mengen scheinbar nicht zur „Histobasen"-Gruppe gehöriger Stoffe an der Kupplungs-Reaktion beteiligt sind. Demnach ist es nicht mit Sicherheit entschieden, dass die Lang'sche Fällung mit komplexem Quecksilbersalz selektiv auf Hexonbasen anspricht, wenn es sich bei der Untersuchungslösung nicht um ein Gemisch eindeutig charakterisierter Stoffe handelt, wie dies in den vorwiegend meisten Untersuchungslösungen von K. Lang der Fall war. Darauf soll an anderer Stelle noch näher eingegangen werden.

Maggi-Fleischbrühe und **Marmite** (Hefeextrakt) verhalten sich ebenso wie Liebigs-Fleischextrakt, nur mit dem Unterschied, dass hier sowohl der „Histobasen-" wie der Histidin- und Histamin-Gehalt wesentlich niedriger als der der vorstehend untersuchten Ausgangsstoffe ist. Die Verteilung des Histidins und Histamins gegenüber dem „Histobasen"-Gehalt ist grössenordnungsgemäss die gleiche, insofern als hier ebenfalls festgestellt werden kann, dass ein geringer Anteil (0,18g bei Maggi-Fleischbrühe und 0,33g bei Marmite) nicht als Histidin und Histamin charakterisiert werden kann.

Fisch.

Hier erstreckte sich die Untersuchung ebenfalls auf rohes, gekochtes und gebratenes Fischfleisch. Die Zubereitung durch Kochen erfolgte so, dass 100g (Kabeljau-Filet) in 400ccm kaltes Wasser eingelegt und 1 Stunde zum Sieden erhitzt wurden. Das ausgekochte Fischfleisch wurde wie üblich hydrolysiert und in dem Hydrolysat der Gesamt-Protein-Gehalt bestimmt. Das Braten wurde in der Weise vorgenommen, dass 100g Fischfilet unter Zusatz von etwas Margarine (Vermeidung des Anbrennens) bis zur leichten Bräunung erhitzt wurde. Die Bestimmung der „Histobasen" und ihre Trennung durch Elektrodialyse erfolgte bei gekochtem und gebratenem Fisch in gleicher Weise wie beim Fleisch.

Tabelle 10

Untersuchte Stoffe	Histobasen	Histidin	Histamin	Summe Histidin + Histamin
	g in 100g Trockensubstanz			
Fisch				
Rohfisch	2,90	2,87	1,58	4,45
Gekochter Fisch	2,02	1,75	0,08	2,55
Gebratener Fisch	3,10	2,28	0,93	3,21

Der „Histobasen"-Gehalt des ungekochten Fisches liegt bei 2,9 g und erreicht einen Wert, der von demjenigen des Rohfleisches weit entfernt ist. Der niedrigere Gehalt bei gekochtem Fisch könnte den Anschein erwecken, dass durch diese Zubereitungsart keine Freilegung oder Bildung von „Histobasen" stattfindet. Es ist aber vielmehr die Annahme berechtigt, dass infolge der günstigen Diffusionsbedingungen die präformiert oder nachträglich gebildeten Histidinhaltigen Stoffe herausgelöst und daher in der Fischbrühe nachweisbar sein müssen.

Diese Überlegung erklärt auch den relativ niedrigen „Histobasen"-Gehalt des gebratenen Fleisches, der in unserem Falle bei der Zubereitung in kleine bis kleinste Stückchen zerfiel, die einerseits durch das ausgetretene Wasser, andererseits durch das verwendete Fett schwach ausgelaugt wurden. Auch hier müsste ein gewisser Anteil an „Histobasen" im Bratensaft nachweisbar sein.

Während sich die Histidin-Werte in ziemlich einheitlicher Grössenordnung, und zwar zwischen 1,75 und 2.87 g bewegen, liegen bei den Histamin-Werten nur diejenigen des gekochten und gebratenen Fisches nahe beisammen. Grundsätzlich sind aber die Histamin-Werte auffallend hoch und liegen durchschnittlich mit einem Wert von 0,93 g über denjenigen von Fleisch.

Getreide und Getreideerzeugnisse, Kaffee

Bei der verwendeten Gerste handelte es sich um eine Gerste der Herkunft Rheinhessen*). Das daraus hergestellte Malz war hell gedarrtes Malz, das in üblicher Weise brauereitechnisch gewonnen war. Das untersuchte Brot war ein Roggenbrot, das in der Pfitzer-Bäckerei, München, als gangbarstes Haushaltsbrot hergestellt wird. Der Zwieback (Butterzwieback) wurde von der Firma Pauly (Friedrichsdorf) zur Verfügung gestellt. In Anlehnung an frühere Untersuchungen wurden auch Rohkaffee und gerösteter Kaffee**) in der selben Weise überprüft.

Sämtliche Ausgangsstoffe wurden in einer Schrotmühle fein vermahlen und das Mahlgut mit Salzsäure hydrolysiert. Die Aufarbeitung: Lang'scher Füllung, Elektrodialyse und kolorimetrische Auswertung erfolgte in gleicher Weise wie bei den schon aufgeführten Stoffen.

Die vorstehenden Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß die untersuchten pflanzlichen Stoffe ungleich niedrigere „Histobasenwerte" gegenüber ebensolchen tierischen Ausgangsmaterialien aufweisen. Hier treten Höchstwerte von 360 mg gegenüber einem

*) **) Gerste und Malz wurden uns in liebenswürdiger Weise von der Henninger-Brauerei A. G., Frankfurt a. M., der Rohkaffee und der geröstete Kaffee von der Firma A. Darboven, Hamburg, zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle verbindlichst danken.

Höchstwert von 5460 mg (gebratenes Fleisch) auf. Dies hängt, wie früher schon beobachtet wurde, mit dem natürlichen Gehalt an Histidin haltigem Eiweiß zusammen. Vergleicht man aber die Werte von Gerste und Malz untereinander, so ist hier die Übereinstimmung der „Histobasen", der Histidin- und Histamin-Werte auffallend. Hervorhebenswert ist aber das starke Überwiegen des Histidins gegenüber dem Histamin in 5 bis nahezu 10-facher Menge.

Tabelle 11

Untersuchte Stoffe	Histobasen	Histidin	Histamin	Summe Histidin + Histamin
	g in 100 g lufttrockener Substanz			
Getreide u. Getreideerzeugnisse, Kaffee				
Gerste	0,36	0,21	0,04	0,25
Malz	0,36	0,29	0,02	0,31
Brot	0,14	0,14	0,06	0,20
Zwieback	0,20	0,20	0,07	0,27
Rohkaffee	0,25	0,26	0,10	0,36
Gerösteter Kaffee	0,27	0,20	0,11	0,31

Bei der Untersuchung des Brotes handelt es sich vor allem um die Feststellung, inwieweit in der Brotrinde, also in demjenigen Teil, der am stärksten der Hitze ausgesetzt ist, durch die Diazoreaktion erfaßbare Veränderungen eintreten. Diese Veränderungen beruhen einmal auf einer Hydrolyse und Dextrinbildung, zum anderen auf einer Denaturierung von Eiweiß. Weiterhin ist auch die Möglichkeit zur Melanoidin-Bildung[1]) gegeben. Daneben ist bei der Hitzeeinwirkung mit einer Freilegung oder Bildung von Histidin-artigen Stoffen zu rechnen. Dasselbe, wenn auch in geringerem Maße gilt für die Zwiebackzubereitung, wo niedrigere Backtemperaturen Anwendung finden.

Die Versuchsergebnisse bringen zum Ausdruck, daß bei Brot die Werte für „Histobasen" und Histidin sich in gleicher Höhe bewegen, weshalb erwartungsgemäß auch der Histamin-Wert im Verhältnis zu Histidin nur ein niedriger sein konnte. Der experimentelle Versuch liefert auch nur einen Wert von 60 mg. Ähnliche Verhältnisse treffen auch bei Zwieback zu.

[1]) W. Diemair und F. Arnold, Z. Unters. Lebensm. **70**, 480 (1925)

Frühere Untersuchungen an Kaffee wiesen daraufhin, daß durch die Anwendung höherer Temperaturen, also beim Rösten der Bohnen, eine Freilegung von „Histobasen" erfolgt. Diese Beobachtungen wurden auch durch die vorliegenden experimentellen Ergebnisse bestätigt, wonach der Gehalt des gerösteten Kaffees an „Histobasen" gegenüber dem Rohkaffee von 250 mg auf 270 mg zunimmt. Die Fraktionierung des „Histobasen-Gemisches" läßt jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen geröstetem und ungeröstetem Material erkennen.

Leberextrakte.

Die Erkenntnis der großen Bedeutung der „Histobasen" in physiologischer und pharmakologischer Hinsicht legte den Gedanken nahe, solche Stoffe auch in Organen des tierischen Körpers, wo ihre Bildung zu erwarten ist, mengenmäßig zu bestimmen; unter diesen Organen spielt wohl die Leber, die als größtes Organ des tierischen Körpers mit etwa 12% am Gesamtenergie-Umsatz beteiligt ist, eine sehr wichtige Rolle. Die Leber wird als Heilmittel insofern angewandt, als sie in Form ihrer wässrigen Auszüge entweder oral oder als intramuskuläre Injektion verabreicht wird.

Therapeutisch wirksame Versuche mit Leber wurden zum 1. Mal von Minot und Murphy zusammen mit Whippel zur Bekämpfung der bis dahin (1924) unheilbaren perniciösen Anämie durchgeführt, wobei sie solche Erfolge erzielen konnten, daß die „Lebertherapie" heute allgemein die unentbehrliche Grundlage zur Behandlung perniciöser Anämien wie auch der meisten Anämien bildet. Die Aufklärung der Natur des antianämisch wirksamen Leberstoffes machte nur geringe Fortschritte, obwohl eine Reihe von Forschern (Cohn, Minot und Murphy, West und Howe, Dakin und West) sich eingehend mit der Fragestellung beschäftigt hatten. Auch über die Art der Wirkung haben sich verschiedene hypothetische Vorstellungen herausgebildet, von welchen besonders die Anschauung von Castle zu erwähnen ist, der vermutet, daß das „wirksame Prinzip" durch das Zusammenwirken verschiedener Stoffe entsteht. Im Hinblick auf unsere Aufgabenstellung ist die Ansicht französischer Autoren (Fontés und Thivolle) bemerkenswert, die glauben, in Tryptophan und Histidin die unentbehrlichen Vorstufen für den Aufbau des Blutfarbstoffes gefunden zu haben. Die Ermittlung des Histidin- und Histamin-Gehaltes in therapeutisch wirksamen Leberextrakten nach dem oben geschilderten Verfahren schien daher von besonderem Interesse zu sein.

Folgende Leberextrakte wurden in derselben Weise wie die vorher untersuchten Stoffe auf „Histobasen", Histidin und Histamin überprüft, wobei zur Lang'schen Fällung Mengen zwischen 1 und 2 ccm Hydrolysat — je nach dem Gehalt an Gesamtstickstoff — verwendet wurden.

Tabelle 12

Untersuchte Stoffe	Histobasen	Histidin	Histamin	Summe Histidin + Histamin
	g in 100 ccm Leberextrakt			
Leberextrakte				
Campolon	0,30	0,28	0,05	0,33
Hepatopson	0,21	0,20	0,03	0,23
Hepatopson forte	0,66	0,49	0,15	0,64
Pernämyl forte	0,29	0,31	0,04	0,35
Hepatrat forte	0,32	0,28	0,04	0,32

Die in Tabelle 12 zusammengestellten Versuchsergebnisse lassen eine gute Übereinstimmung unter den „Histobasen"-Mengen erkennen mit Ausnahme von Hepatopson forte, wo ein Wert von 660 mg ermittelt wurde. Bei den anderen Fräparaten bewegt sich der Gehalt zwischen 210 und 320 mg. Pernämyl forte und Campolon weisen einen Gehalt von rd. 300 mg. auf.

Interessant und hervorhebenswert sind nun die Versuchsergebnisse der elektrodialytisch getrennten Stoffe Histidin und Histamin, deren Summenwerte fast durchwegs mit den „Histobasen"-Werten übereinstimmen, mit Ausnahme von Pernämyl forte, wo die Summe Histidin + Histamin über dem Gesamt-„Histobasen"-Wert liegt. Diese auffallende Übereinstimmung läßt sich nur damit erklären, daß bei den vorliegenden Erzeugnissen eine weitestgehende Enteiweissung stattgefunden hat, sodaß die bei den anderen untersuchten Stoffen möglicherweise mitreagierenden Substanzgruppen von vornherein ausgeschaltet waren. Nach diesen Versuchsergebnissen kann mit Hilfe der Elektrodialyse eine nahezu quantitative Trennung zwischen Histidin und Histamin erreicht werden. Bezüglich des mit Sicherheit festgestellten Histidin- und Histamin-Charakters sind diese Ergebnisse insofern aufschlußreich, als nach den bisherigen Untersuchungsergebnissen das Auftreten von Imidazol-Abkömmlingen noch ziemlich zweifelhaft war. Die hierüber auffindbaren Literaturangaben sind sehr lückenhaft und gehen ziemlich auseinander, da der eine Teil sich für, der andere gegen eine Mitbeteiligung von Histidin-artigen Stoffen ausspricht. Die vorliegenden Versuchsergebnisse lassen zweifelsfrei erkennen, daß derartige Stoffe in Leberextrakten allerdings in wechselnder Menge auftreten, ohne daß aber sichere Angaben darüber gemacht werden können, in welcher Bindungsart sie vorliegen.

Die Möglichkeit einer Bildung oder Umwandlung solcher Stoffe aus dem vorhandenen Eiweißkomplex durch Einflussnahme der bei

der Herstellung und Aufarbeitung angewandten höheren Temperaturen ist nicht ausgeschlossen. Hier eröffnen sich also interessante Perspektiven bezüglich des noch wenig aufgeklärten „wirksamen Prinzips" der Leberextrakte und damit bezüglich ihrer therapeutischen Verwendung bei Anämien, vielleicht auch der perniciösen Anämie.

II. Nachweis und Bestimmung der „Histobasen" auf biologischem Weg.

Aus den chemischen Ergebnissen geht hervor, dass der Gehalt an „Histobasen" in den untersuchten Stoffen verhältnismässig hoch ist, und dass bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln gegebenenfalls mit einer Freilegung und Bildung von „Histobasen" zu rechnen ist. In der Absicht, die Beweisführung noch sicherer zu gestalten, wurde nun noch ein biologisches Nachweisverfahren gewählt, das, wie schon in der Einführung erwähnt, auf der ausserordentlich grossen Empfindlichkeit des überlebenden Meerschweinchen-Darmes gegenüber Histamin beruht und damit ein äusserst feines Nachweismittel, selbst für kleinste Mengen von Histamin darstellt. Der biologische Nachweis wurde nach einem Arbeitsverfahren durchgeführt, das schon in der Gemeinschaftsarbeit von B. Bleyer, W. Diemair, F. Fischler und K. Täufel[1]) bei der Bestimmung von Röstprodukten angewandt worden war.

Arbeitsgang.

Der dem chloroformiertem Tiere entnommene Dünndarm wurde in Stücken von etwa 20 cm nahe dem Darm vom Mesenterium gelöst und zwei- bis dreimal mit körperwarmer Tyrodelösung unter Anwendung geringen Druckes durchspült. Dann wurde der Darm in frischer Tyrodelösung aufbewahrt. Etwa 5 cm lange Stücke des Darmes wurden in üblicher Weise mit Seidenfäden zirkulär abgebunden, die einerseits am Schreibhebel, andererseits am Sauerstoff zuführenden, entsprechend gebogenen Glasrohr befestigt wurden, wobei das Glas in einigen Bläschen alle 2 bis 3 Sekunden durch die Flüssigkeit perlte. Die Schreibhebellänge betrug 18 cm. Die Untersuchungen wurden am ganz frischen Darm oder an 1 bis $1^1/_2$ Tage alten Stücken vorgenommen, die allmählich auf Körpertemperatur gebracht wurden (38—39° C.) Die Därme wurden in der Längsrichtung aufgeschnitten, sodass die zugesetzte Substanz nur von aussen her an die Muskulatur, gelangen konnte, womit auch schwer übersehbare Einwirkungen von Verdauungsfermenten oder Speiseresten im Darmlumen auf die zugesetzten Stoffe vermieden wurden. Zur Schreibhebelaufzeichnung kamen nach dieser Versuchsanordnung nur Kontraktionen der Längsmuskulatur. Die Apparatur blieb in allen Versuchen die gleiche. Alle Darmstücke waren in einem Gefäss mit frischer Tyrodelösung von

[1]) loc. cit.

200 ccm aufgehängt, das in einem grösserem, zur Aufrechterhaltung der Temperaturkonstanz mit warmen Wasser gefülltem Gefäss stand, dessen Temperatur seinerseits durch eine elektrische Wärmplatte mit der zwischengelegten Asbestplatte geregelt wurde. Beim Wechseln der Tyrodelösung wurde die frische Lösung vorher auf 38° C gebracht.

Unter Einhaltung vollständig gleicher Versuchsbedingungen der geschilderten Art schien ein Vergleich mit den chemischen Versuchen möglich. Die Chloroform-Narkose zeigte keine schädliche Nachwirkung auf die Därme, wenn diese dem tief chloroformierten aber dem noch lebenden Tiere entnommen wurden. Die Erregbarkeit der Darmstücke war am grössten bei möglichst lebensfrischem Darm und sank beim Aufbewahren ziemlich rasch ab. Je nach dem Ernährungszustand der Tiere war auch die Reizbarkeit der Därme verschieden, so zeigten in voller Verdauung befindliche Därme eine bei weitem stärkere Kontraktion als die Därme von Tieren, die gehungert hatten. Das Studium der Histidin- und Histamin-Einwirkung unter den geschilderten Bedingungen hatte folgendes Bild ergeben:

Unterhalb einer Grössenordnung von etwa 30 γ konnte trotz längerer Beobachtungszeit keine Einwirkung auf den Darm festgestellt werden. Die Anzeichen hierzu begannen erst mit 50 γ, die der Tyrode-Lösung unter Umrühren zugesetzt wurden, wobei durch Erhöhung der Konzentration die Deutlichkeit der Reaktionsweise und die Schnelligkeit ihres Eintretens zunahm. Die Kennzeichen der Histidineinwirkung waren folgende:

Stetiges, langsames Ansteigen des Kurvenhebels und allmähliches Lebhafterwerden der Darmkontraktionen, ohne dass dabei eine sprunghafte Änderung im Kurvenbild eintrat. Diese erfolgte jedoch beim Aussetzen der Sauerstoffzufuhr. Die Kontraktionen und damit die Kurvenausschläge wurden stärker und gleichzeitig langsamer. Ebenso wurden auch durch das Rühren der Tyrodelösnng stärkere Kontraktionen hervorgerufen, da hierdurch mehr Histidin an den Darm gelangte. Auch das Wiederzuströmen von Sauerstoff bewirkte eine kurze Kurvenerhöhung, wobei jedoch im Gegensatz zu vorhin ein schnelles Abklingen der Bewegung festgestellt wurde. Die erhöhte Darmtätigkeit bei Sauerstoffsperre schien aber nicht ihren Grund in der mechanischen Durchrührung der Tyrodelösung zu haben, sondern musste, da die Wirkung, wie aus Blindversuchen hervorgingen, viel zu gering war, auf eine andere Ursache zurückgeführt werden. Anscheinend trat auch eine Histidinspeicherung ein, denn beim Ersatz der Histidin-haltigen Tyrodelösung durch Histidin-freie, stellte sich die normale unbeeinflusste Darmreaktion nur langsam wieder ein.

Ganz anders verhielt sich demgegenüber Histidin. Schon Mengen von 0,2—1,0 γ bewirkten eine ausserordentlich starke Darmkontraktion Das Kurvenbild sah etwa folgendermassen aus:

Bei Zugabe von 1 γ zur Tyrodelösung, hohes, fast senkrechtes Aufsteigen der Kurve mit einigen geringen Nachschwankungen, hierauf horizontaler Verlauf in etwas geringerer Höhe. Bei kleineren Mengen (etwa 0,5) γ stieg der Kurvenhebel zwar ebenso steil an, jedoch bei weitem nicht so hoch wie vorher und fiel schon nach wenigen Minuten wieder ab. Die Reaktionsfähigkeit des Darmes drückte sich hierbei in der Steilheit des An- und Abstiegs aus. Bei stark erregbaren Därmen riefen schon Konzentrationen von 0,2—0,5 γ einen hohen Kurvenverlauf hervor. 2—3 γ bewirkten einen sehr hohen Anstieg, der sich dann lange Zeit mit nur geringen Schwankungen plateauartig auf fast derselben Höhe hielt und nur langsam abfiel. Durch Ersatz der Histamin-haltigen Tyrodelösung mit Histamin-freier wurde die Histamin-Wirkung fast sofort aufgehoben, woraus hervorging, dass Histamin seiner grossen Löslichkeit wegen leichter ausgewaschen wird als Histidin. Die Veränderungen bei Sauerstoffsperre und bei Sauerstoffzufuhr waren bei weitem nicht so deutlich ausgeprägt.

Über die Art der Wirkungsweise, insbesondere bei Histamin ist nichts genaues bekannt. Es kann sich hier um eine direkte Einwirkung auf die Muskulatur des Darmes, auf seinen nervösen Versorgungsapparat oder auch um eine Einwirkung auf beide Systeme handeln. Auffallend bei diesen Versuchen erschien, dass bei höherer Konzentration von Histidin eine Aehnlichkeit zwischen Histidin- und Histimin-Wirkung bestand. Dies wurde besonders während der Sauerstoffsperre ersichtlich, wo bei gleichzeitigem Durchrühren der Lösung sofort ein steiles Ansteigen der Kurve erfolgte. Im Gegensatz hierzu setzte bei Sauerstoffzufuhr nach kurzem Ansteigen des Kurvenhebels — dies beruhte auf der Rührwirkung der Sauerstoftblasen — ein rascher Abstieg zum normalen Kurvenverlauf wieder ein.

Aus diesen Beobachtungen heraus konnte sich die hypothetische Vorstellung bilden, dass die Histidin-Wirkung eigentlich nur die Wirkung geringer Histamin-Mengen darstellt, denn die starken Unterschiede im Histidin- und Histamin-Kurvenbild verschwinden bei der Verwendung grösserer Histidin-Mengen. Im Hinblick darauf war bei hohen Histidin-Konzentrationen der Einfluss der Sauerstoffsperre bezeichnend. Es kam hierbei im Kurvenbild zu steil verlaufenden An- und Abstiegen, deren Ursache in der Sauerstoffsperre zu suchen war, denn bei Wiederzufuhr von Sauerstoff stellte sich nach kurzem Kurvenanstieg, der durch die Rührwirkung der Sauerstoffblasen hervorgerufen war, bald wieder die unbeeinflusste Darmreaktion ein.

Als Erklärung für diese Beobachtungen konnte nur angenommen werden, dass durch das Fehlen der katalytischen Wirkung des Sauerstoffs während der Sauerstoffsperre der Abbau des Histidins bei der Histamin-Stufe stehen bleibt und somit sich eine Histaminanhäufung bildet, die für die stärkere Darmwirkung verantwortlich

zu machen war. Durch die Zufuhr von Sauerstoff erfolgt wieder ein rascherer Abbau von Histidin und damit die Vermeidung der Anhäufung von Histamin. Eine Bestätigung dieser Anschauung bildete auch die aus den Kurvenbildern sich ergebende Tatsache, dass der Anstieg der Kurve bei Histaminzugabe sofort beginnt, während er bei Histidin-Zugabe langsam und erst bei 100-facher und noch grösserer Konzentration einsetzt. Die wahre Ursache der Darmerregbarkeit schien daher das Histamin zu sein. Damit musste auch eine Veränderung des Histidins bei seiner am oder im Darm erfolgenden Einwirkung vorausgesetzt werden. Im Hinblick darauf kann an die, unter Wirkung von Bakterien, vor allem von Coli-Bakterien erfolgende Bildung von Histamin, sowie an die im Gewebe verhältnismässig leicht vor sich gehende Dekarboxylierung von Histidin erinnert werden.

Bei den beschriebenen Versuchen war auch die Wirkung der Sauerstoffsperre und ebenso der Wiederzufuhr von Sauerstoff auf den in Tyrodelösung befindlichen Darm ohne alle Zusätze geprüft worden. Hierbei konnte festgestellt werden, dass zwischen Därmen, die schon einige Zeit in Tyrodelösung gelegen hatten und solchen, die sich in voller Verdauung befanden, ein Unterschied in der Reaktionsweise bestand. Bei den erstgenannten trat während der Sauerstoffsperre eine regelmässige Senkung der Kurve ein, bei Wiederzufuhr von Sauerstoff ein ebenso regelmässiger Wiederanstieg. Die in voller Verdauung befindlichen Därme dagegen, die möglichst schnell in die Versuchsanordnung des Kymographions gebracht worden waren, zeigten bei Sauerstoffsperre eine erhöhte Kontraktionstätigkeit, während Sauerstoffzufuhr wieder einen normalen Kurvenverlauf herstellte. Wurden diese Därme dagegen einige Zeit in Tyrodelösung aufbewahrt, so trat bald wieder die normale Reaktionsweise des unbehandelten Darms. Somit war also die Ansicht gerechtfertigt, dass bei einem, in voller Verdauung befindlichen Darm Histidin gebildet wird, dessen Abbauprodukt Histamin während der Sauerstoffsperre die erhöhte Darmreaktion hervorruft.

Bei der spezifischen Wirkung derartig geringer Mengen war somit auch in unserem Falle die Möglichkeit gegeben unter Zuhilfenahme dieser Beobachtungen eindeutig die Indentität von Histidin bzw. Histamin zu beweisen.

Überraschender Weise ergaben jedoch wie aus Tabelle 13 hervorgeht, die durch Lang'sche Fällung und Elektrodialye gewonnenen „Histobasen"-, Histidin- und Histamin-Fraktionen im wesentlichen nur eine Histidin-Reaktion und selbst diese trat nicht in allen Fällen ein. Die Ursache dieser auffallenden Tatsache kann nur in einer Hemmung bzw. in einer vollständigen Hinderung der Darmkontraktion durch störende Stoffe beruhen, nachdem die einzelnen Fraktionen deutlich die Diazoreaktion erkennen liessen. Da die Elektrodialyse mit Quecksilber und Cyanidhaltigen Lösungen vorgenommen

wird, mussten zunächst diese Stoffe als „Hemmungsstoffe" vermutet werden; tatsächlich findet nach unseren Beobachtungen auch eine Wanderung von Quecksilberionen zur Kathode statt, während das Cyanidion als negatives Ion nur im Anodenraum, dessen Inhalt keine weitere Verwendung findet, auffindbar ist. Weiterhin könnte das Barium störend einwirken, eine Annahme, die aber mit dem Ausbleiben der Darmkontraktion bei Verwendung der nicht mit Barytwasser behandelten „Histobasen"- Lösung nicht in Einklang zu bringen ist. Schliesslich muss noch auf den etwaigen störenden Einfluss der Kohlensäure hingewiesen werden. Kohlensäure wird zwar während der Elektrodialyse in den Kathodenraum eingeleitet, doch ist mit Sicherheit mit ihrer vollständigen Entfernung durch die folgende Vakuumdestillation zu rechnen. Die hemmende Wirkung der Kohlensäure beim biologischen Nachweis des Histamins am überlebenden Meerschweinchendarm erwähnt in jüngster Zeit R. Sami Garan[1]). Trotz dieser vielfachen Vorstellungen ist aber eine eindeutige Erklärung der Ursache des Ausbleibens der Darmkontraktion bei Zufuhr der dialysierten Lösung nur schwer möglich.

C. Zusammenfassung

Der „Histobasen"-Gehalt von Nahrungs- und Heilstoffen tierischer und pflanzlicher Herkunft und die Veränderung, die sich durch die Zubereitung und Herstellung ergeben, bedürfen vielfach noch einer Überprüfung; andererseits ist auch die Notwendigkeit einer einwandfreien mengenmässigen Erfassung angesichts der grossen physiogischen und pharmakologischen Bedeutung dieser Stoffe gegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurden nun eine Reihe von Nahrungsstoffen wie Fleisch, Fisch und deren Zubereitungsformen, Getreide und Getreideerzeugnisse, Kaffee im rohen und geröstetem Zustand und Leberextrakte, die therapeutische Verwendung finden, auf ihren „Histobasen"-Gehalt untersucht. Gleichzeitig wurde eine Trennung der „Histobasen" in Histidin und Histamin durch ein besonders ausgearbeitetes Verfahren durchgeführt. Um den Gehalt an diesen Stoffen mengenmässig ermitteln zu können, wurde zunächst eine Isolierung der „Histobasen" nach einer abgeänderten Methode von K. Lang vorgenommen, hierauf ein neues Reinigungs- und Trennungsverfahren unter Benutzung der „Elektrodialyse" ausgearbeitet. Weiterhin wurde eine, auf der Pauly'schen Diazoreaktion beruhende kolorimetrische Bestimmungsmethode verbessert.

Die Überprüfung der chemischen Ergebnisse erfolgte mit Hilfe eines biologischen Nachweisverfahrens am überlebenden Meerschweinchendarm.

[1]) Klin. Wschr. 41, 1435 (1937)

Aus den chemischen und physiologischen Versuchen ergab sich zusammenfassend:

1. Das abgeänderte Verfahren nach K. Lang eignet sich zur Isolierung von „Histobasen."
2. Mit Hilfe der Elektrodialyse wird eine gute Reinigung der durch die Lang'schen Fällung gewonnenen Hexonbasen erreicht.
3. Die Elektrodialyse kann weiterhin zur Trennung der „Histobasen" in Histidin und Histamin herangezogen werden.
4. Zur quantitativen Bestimmung eignet sich ein verbessertes kolorimetrisches Verfahren, dessen Vorteil in der Verwendung einer einheitlich zusammengesetzten Diazoniumsalzlösung besteht. Dies wird durch Anwendung von kristallisiertem p-Nitrophenylantidiazotat erreicht. Durch Salzsäure lässt sich das anti-Diazotat leicht in das entsprechende Diazoniumsalz umlagern.
5. Die auf chemischem Wege gewonnen Ergebnisse bei den verschiedenen Untersuchungsstoffen lassen erkennen, dass der „Histobasen"-Gehalt der tierischen Stoffe denjenigen der pflanzlichen bei weitem übertrifft.
6. Bei Frischfleisch und Fischfleisch scheinen auch noch andere Histidin- bzw. Histaminähnliche Stoffe an der Diazoreaktion beteiligt zu sein, sodass anzunehmen ist, dass die Lang'sche Fällung in diesem Falle nicht genügend selektiv wirkt.
7. Die „kolorimetrisch" erhaltenen Werte bei Getreide und Getreideerzeugnissen sowie bei rohem und geröstetem Kaffee stehen in Übereinstimmung mit den früher erhaltenen Werten.
8. Der „Histobasen"-Gehalt der verschiedenen Leberextrakte liegt mit einer einzigen Ausnahme grössenordnungsgemäss auf gleicher Höhe. Die Summen der Histidin- und Histamin-Werte stimmen hier gut mit den ermittelten Gesamt-„Histobasen"-Werten überein.
9. Der biologische Befund deckt sich nicht mit chemischen. Hier scheint eine Hemmung der Darmkontraktionen durch Spuren von Quecksilber eingetreten zu sein.
10. Quecksilbersalze werden zur Ausfällung der Hexonbasen nach K. Lang verwendet und es gelingt, trotz Einhaltung genauester Arbeitsbedingungen, nicht das Quecksilber vollständig aus der Untersuchungslösung zu entfernen. Die noch verbliebenen Quecksilberspuren dürften die Ursache für den biologischen Reaktionsausfall sein.

Tabelle 13

Biologische Prüfung der chem. Versuchsergebnisse.

Untersuchte Stoffe		je in 5 ccm	Histamin	Histidin
1)	Rohfleisch (Histobasen = Hb)	960	—	+
2)	„ (Histamin = Ha)	325	—	+
3)	„ (Histidin = Hd)	810	—	+
4)	Gekochtes Fleisch (Hb)	1880	—	—
5)	„ „ (Ha)	275	—	—
6)	„ „ (Hd)	530	—	—
7)	Braten (Hb)	1500	—	—
8)	„ (Ha)	360	—	—
9)	„ (Hd)	925	—	—
10)	Liebigs Fleisch-Extrakt (Hb)	2000	—	—
11)	„ „ (Ha)	120	—	?
12)	„ „ (Hd)	400	—	++
13)	Maggi (Hb)	700	—	+
14)	„ (Ha)	400	—	+
15)	„ (Hd)	350	—	+
16)	Marmite (Hb)	520	—	+
17)	„ (Ha)	310	—	+
18)	„ (Hd)	375	—	++
19)	Rohfisch (Hb)	655	—	+
20)	„ (Ha)	300	—	+
21)	„ (Hd)	650	—	++
22)	Gekochter Fisch (Hb)	480	—	—
23)	„ „ (Ha)	275	—	+
24)	„ „ (Hd)	395	—	+
25)	Gebratener Fisch (Hb)	700	—	—
26)	„ „ (Ha)	275	—	++
27)	„ „ (Hd)	520	—	+
28)	Gerste (Hb)	675	—	—
29)	„ (Ha)	100	—	+
30)	„ (Hd)	385	—	—
31)	Malz (Ha)	65	—	+
32)	„ (Hd)	550	—	+ ?
33)	Brotrinde (Hb)	255	—	+
34)	„ (Ha)	145	—	—
35)	„ (Hd)	275	—	++
36)	Zwieback (Ha)	168	—	—
37)	„ (Hd)	275	—	+
38)	Rohkaffee (Hb)	376	—	+
39)	„ (Ha)	285	—	++
40)	„ (Hd)	395	—	++
41)	Gerösteter Kaffee (Hb)	400	—	+
42)	„ „ (Ha)	330	—	++
43)	„ „ (Hd)	300	+ ?	++
44)	Campolon (Hb)	565	—	++
45)	„ (Ha)	120	—	+
46)	„ (Hd)	530	—	—
47)	Hepatopson (Hb)	655	—	—
48)	„ (Ha)	210	—	+
49)	„ (Hd)	625	—	+
50)	Hepatopson forte (Hb)	830	—	—
51)	„ (Ha)	190	—	—
52)	„ (Hd)	310	—	+ ?
53)	Perneamyl forte (Hb)	675	—	+
54)	„ (Hb)	120	—	—
55)	„ (Hd)	675	—	—
56)	Hepatrat forte (Hb)	600	—	—
57)	„ (Ha)	165	—	+
58)	„ (Hd)	525	—	+

Lebenslauf.

Am 11. Juli 1912 wurde ich als Sohn des Apothekenbesitzers Dr. Ludwig Eberlein zu Oberbronn i. Elsass geboren. Nach 4 Jahren Volksschule in Oberbronn und München besuchte ich das Ludwigs-Gymasium in München und bestand im Jahre 1931 die Reifeprüfung. Anschliessend widmete ich mich dem Apotheker-Berufe. Nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Karlsplatz-Apotheke zu München bestand ich das pharmazeutische Vorexamen. Das anschliessende pharmazeutische Studium an der Universität München schloss ich nach 4 Semestern im Jahre 1935 mit dem pharmazeutischen Staatsexamen ab.

In den folgenden Semestern studierte ich Chemie und bestand im Sommer 1936 das 2. chemische Verbandsexamen. Vom Wintersemester 1936 ab widmete ich mich der vorliegenden Promotionsarbeit im Labaratorium der Deutschen Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie in München und am Institut für Nahrungsmittelchemie der Universität Frankfurt a. M.